

**Implikation eines genomischen Polymorphismus für Diagnostik
und Risikostratifizierung bei polytraumatisierten Patienten am
Beispiel des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-1)-Promotor
Genpolymorphismus**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Little, Simon Gunter

aus Bad Nauheim

Gießen 2003

Aus dem Medizinischem Zentrum für
Chirurgie, Anaesthesiologie und Urologie
Abteilung Anaesthesiologie, Intensivmedizin, Schmerztherapie
Leiter: Prof. Dr. Dr. h.c. G. Hempelmann
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Herr PD Dr. T. Menges

Gutachter: Herr Prof. Dr. G. Bein

Tag der Disputation: 23.10.2003

Für Maren & Niklas Laurenz

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	6
1.1	EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK	6
1.2	POLYTRAUMA UND MULTIORGANVERSAGEN	7
1.2.1	DEFINITION UND EPIDEMIOLOGIE DES POLYTRAUMAS	7
1.2.2	KLASSIFIKATION UND BEURTEILUNG EINES POLYTRAUMAS	7
1.2.2.1	Der ISS-Score	7
1.2.2.2	Der PTS-Score	9
1.2.2.3	Der APACHE II- und APACHE III-Score	10
1.2.3	IMMUNREAKTION NACH POLYTRAUMA	10
1.2.4	MULTIORGANVERSAGEN NACH POLYTRAUMA	11
1.2.5	EPIDEMIOLOGIE DES MULTIORGANVERSAGENS NACH POLYTRAUMA	13
1.3	BEDEUTUNG DER GERINNUNG UND FIBRINOLYSE IM ENTZÜNDUNGSGESCHEHEN	14
1.3.1	EINFÜHRUNG	14
1.3.2	ROLLE DES GERINNUNGS- UND FIBRINOLYSESYSTEMS IM ENTZÜNDUNGSPROZESS	15
1.3.3	DER PAI-1-GENPOLYMORPHISMUS	18
1.4	FRAGESTELLUNG	20
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	STUDIENDESIGN	21
2.2	MESSZEITRAUM UND BEHANDLUNG DER PATIENTEN	22
2.2.1	MONITORING	22
2.2.2	INTENSIVMEDIZINISCHE BEHANDLUNG	23
2.2.3	OPERATIONEN	24
2.2.4	KONTROLLE DER ORGANSYSTEME	24
2.2.5	DIE PROSPEKTIVE BEURTEILUNG DER KLINISCHEN SITUATION EINES PATIENTEN	25
2.2.6	DIE PROSPEKTIVE SEPSISKLASSIFIZIERUNG DER PATIENTEN MIT HILFE VON SCORESYSTEMEN	27
2.3	LABORMETHODIK UND MESSPARAMETER	30
2.3.1	MESSPARAMETER	30
2.3.2	ALLGEMEINES PRINZIP DES ENZYME-LINKED-IMMUNOSORBEND-ASSAY (ELISA)	31
2.3.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN	33
2.3.3.1	Prinzip der DNA-Isolation aus EDTA-Vollblut	33
2.3.3.2	Allgemeines Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion	34
2.3.3.3	Theoretische Aspekte der PCR	37
2.3.3.4	Allgemeines Prinzip der elektrophoretischen Auftrennung mit Agarose-Gelen	38
2.3.3.5	Methode der radioaktiven Markierung von Oligodesoxynukleotiden und DNA-Fragmenten	39
2.3.3.6	Verfahren der radioaktiven Hybridisierung	40
2.3.3.7	Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry MALDI-TOF MS)	42
2.3.3.8	Bestimmung der PAI-1-Genotypen mit Autoradiographie	44
2.3.3.9	Bestimmung der PAI-1-Genotypen mit MALDI-TOF MS	45
2.4	STATISTISCHE ANALYSEVERFAHREN	47
2.4.1	DESKRIPTIVE STATISTIK UND HÄUFIGKEITSVERTEILUNG	47
2.4.2	METHODIK DER LOGISTISCHEN REGRESSION	48
3	ERGEBNISSE	50
3.1	GRUNDDATEN	50

3.1.1	UNFALLMECHANISMUS	51
3.1.2	VERLETZUNGSMUSTER	52
3.1.3	OPERATIVE VERSORGUNG	53
3.2	ALLGEMEINE KLINISCHE DATEN	54
3.3	GENOTYPISIERUNG DER POLYTRAUMATISIERTEN PATIENTEN	56
3.4	ERGEBNISSE DER IMMUNOLOGISCHEN MESSPARAMETER DER GENOTYPISIERTEN PATIENTEN	58
3.5	RISIKOABSCHÄTZUNG DES EINZELNEN PATIENTEN	62
4	<u>DISKUSSION</u>	65
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	73
6	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	76
7	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	79
8	<u>ANHANG: VERZEICHNIS DER LABOR- UND MESSPARAMETER</u>	88
8.1	LISTE DER VERWENDETEN ELISA	88
8.2	LISTE DER VERWENDETEN LABORMATERIALIEN	89
8.2.1	DNA-ISOLATION	89
8.2.2	PCR	89
8.2.3	AUTORADIOGRAPHISCHE DETEKTION	89
8.2.4	MALDI-TOF MS	90
9	<u>STUDIENPATIENTEN</u>	91
9.1	BIOMETRISCHE DATEN, GENOTYP, SCORES	91
10	<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	93
11	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	94
12	<u>LEBENS LAUF</u>	95
13	<u>DANKSAGUNG</u>	97

1. Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Das schwere Trauma ist in den westlichen Industrienationen die dritthäufigste Todesursache überhaupt und die häufigste in den ersten drei Lebensdekaden [188]. Durch Fortschritte in der präklinischen und klinischen Versorgung konnte die Gesamtlealität schwer verletzter Patienten gesenkt und damit die Überlebenszeit verlängert werden [68]. Hierzu zählen eine Modernisierung von Rettungsmitteln, eine Verkürzung der Rettungszeiten sowie organisatorische Änderungen mit einer optimierten, standardisierten interdisziplinären Zusammenarbeit bei der Versorgung polytraumatisierter Patienten und einer verbesserten frühzeitig einsetzenden Schocktherapie und Schockprophylaxe [56,68]. Diese Maßnahmen haben im Wesentlichen zur Senkung der hohen Letalität in den ersten 24 Stunden, der unmittelbaren posttraumatischen Phase, beigetragen. Der primäre Behandlungserfolg wird aber häufig durch das Auftreten schwerer sekundärer Komplikationen in Frage gestellt, sodass die Letalität der schweren Mehrfachverletzungen insgesamt sehr hoch bleibt [68,73]. Als Ursache steht dabei ganz im Vordergrund das progressive, septisch-toxische Multiorganversagen (MOV) oder „Multiple Organ Dysfunction Syndrome“ (MODS) als gegenwärtig häufigste Todesursache polytraumatisierter Patienten auf einer Intensivstation [14,15,68,77,190]. Die Vorstellungen über die relevanten Pathomechanismen, die der Entwicklung dieser lebensbedrohlichen Komplikationen zugrunde liegen, sind in den vergangenen Jahren gründlich revidiert worden. Nach heutiger Meinung sind vor allem die initialen Frühveränderungen nach Hochgeschwindigkeitstraumen als die entscheidenden pathomechanistischen Triggermechanismen späterer Komplikationen anzusehen. Die Entwicklung zu einer hochgradig konsumptiven, im Endergebnis aber frustrierten Auseinandersetzung mit den Folgen des Traumas führt zu einer völligen Erschöpfung der körpereigenen Defensivsysteme, die irreversibel und nicht mehr zu korrigieren ist. Die Konsequenz für eine erfolgreiche Intensivtherapie des polytraumatisierten Patienten liegt in einem frühzeitigen Einsatz aller verfügbaren therapeutischen Mittel mit dem Ziel, die körpereigenen Defensivsysteme so frühzeitig wie möglich zu stützen, einzelne immunkompetente Zellsysteme zu schützen und die Entwicklung eines posttraumatischen Immundefektes zu minimieren.

1.2 Polytrauma und Multiorganversagen

1.2.1 Definition und Epidemiologie des Polytraumas

Ein Polytrauma ist die gleichzeitige Verletzung mehrerer Körperregionen oder Organsysteme, von denen mindestens eine Verletzung oder die Summe aller Verletzungen für den Patienten lebensbedrohlich ist [86,187].

Etwa ein Drittel aller Todesfälle nach Unfällen ist auf ein Polytrauma zurückzuführen. Angaben über Inzidenz, Mortalität und Letalität unterscheiden sich zum Teil erheblich, doch kann eine Häufigkeit von 0,5/Million Einwohner/Tag angenommen werden. Die häufigsten Ursachen sind Verkehrsunfälle und Stürze aus größerer Höhe [176]. Durch die Variabilität der bestimmenden Unfallmechanismen gibt es keine typische Verletzung als Polytrauma, sondern eine Vielzahl heterogener Verletzungsmuster, die sehr unterschiedlich auf die Prognose Einfluss nehmen [156,208]. Bezogen auf die Gesamtzahl unfallverletzter Patienten beträgt die Letalität im Krankenhaus 15 bis 18 % [157].

1.2.2 Klassifikation und Beurteilung eines Polytraumas

Für eine Beurteilung der Verletzungsschwere und ihre voraussichtliche Bedeutung für den Krankheitsverlauf ist es notwendig, einheitliche Kriterien für das zu untersuchende Kollektiv zu bestimmen. Nur so ergibt sich eine „Vergleichbarkeit“ der Patienten mit schweren Mehrfachverletzungen. Zur Klassifizierung eines polytraumatisierten Patienten kommen unterschiedliche Score-Systeme zur Anwendung, die mit Hilfe von physiologisch-biochemischen oder anatomisch-morphologischen Kriterien, einzelne oder kombinierte Parameter zugrunde legen. Der Einsatz von Scores hat den Vorteil der systematischen und gründlichen Erfassung aller verfügbaren Daten [81]. Sie dienen der Abschätzung einer individuellen Prognose eines Patienten, zur Evaluierung der Behandlungs- und Ergebnisqualität, als Orientierung für therapeutische Entscheidungen und als Grundlage für epidemiologische Studien.

1.2.2.1 Der ISS-Score

Der Injury-Severity-Score (ISS) von Baker wurde zuletzt 1985 überarbeitet und ist vor allem im angloamerikanischen Raum der am häufigsten eingesetzte Score zum Erfassen

der Verletzungsschwere [10,9]. Der ISS ist ein rein anatomischer Score, der sich mit der Letalität, Morbidität und der Dauer eines Aufenthaltes auf einer Intensivstation korrelieren lässt. Der ISS berücksichtigt jedoch nicht das Patientenalter und gewichtet nicht alle verletzten Körperregionen. Die Sensitivität des ISS, bezogen auf die Vorhersagbarkeit des Überlebens, liegt bei 83 %, die Spezifität bei 96 %. Die Reliabilität wird mit 74 bis 87 % angegeben [117,200].

	Schweregrad				
	1	2	3	4	5
Allgemein	Kleinere Weichteilverletzung	Verbrennung von 10-20% KO, ausgedehnte Weichteilverletzung an 1 oder 2 Extremitäten	3. gradige Verbrennung von 20-30% KO, ausgedehnte Weichteilverletzung an > 2 Extremitäten	2.-3. gradige Verbrennung von 30-50% KO, ausgedehnte Weichteilverletzung mit bedrohlicher Blutung	2.-3. gradige Verbrennung > 50%
Kopf / Hals	Schädeltrauma ohne Bewußtseinstrübung, HWS-Schleudertrauma ohne path. Röntgenbefund	Schädeltrauma mit Bewußtlosigkeit < 15min, ohne retrograde Amnesie, HWS-Schleudertrauma mit röntgenologischen Zeichen	Schädel-Hirn-Trauma mit Bewußtlosigkeit > 15min, ohne Seitenzeichen, retrograde Amnesie bis 3h, dislozierte Frakturen von Kalotte bis Mittelfraktur, Orbita oder Nasennebenhöhlen, HWS-Fraktur ohne Rückenmarksverletzung, Zerstörung des Auges, Optikusabriß	Schädel-Hirn-Trauma mit Bewußtlosigkeit > 15min oder Seitenzeichen, retrograde Amnesie 3-12h, mehrfache Schädelfrakturen	Schädel-Hirn-Trauma mit Bewußtlosigkeit > 24h, retrograde Amnesie > 12h, intrakranielle Blutung, Hirndrucksteigerung, HWS-Fraktur mit Querschnittssymptomatik
Thorax	Thoraxprellung	Einfache Rippen- / Sternumfraktur, Kontusion ohne Behinderung der Atmung	Mehrfache Rippenfrakturen und Lungenkontusion ohne Behinderung der Atmung, Pneumothorax, Hämatothorax, Zwerchfellruptur	Offenes Thoraxtrauma, instabiler Thorax, Pneumomediastinum, Perikardverletzung, Herzkontusion ohne Kreislaufbeeinträchtigung	Thoraxverletzung mit schwerer Atembehinderung, Trachealabriß, Hämomediastinum, Aortenruptur, Myokardruptur, schwere Herzkontusion
Abdomen	Bauchwandkontusion	Ausgedehnte Kontusion des Abdomens	Kontusion von Bauchorganen, retroperitoneales Hämatom, extraperitoneale Blasenruptur, Ureter- und Urethraverletzung, BWS- oder LWS-Fraktur ohne Neurologie	Weniger schwere Verletzung von Abdominalorganen (Milz- / Nierenruptur, Pankreaschwanzkontusion), intraperitoneale Blasenruptur, Genitalverletzung, BWS- oder LWS-Fraktur mit Querschnittssymptomatik	Ruptur oder Perforation abdominalen Organe außer Milz, Blase und Pankreaschwanz
Extremitäten	Verstauchung, Fraktur von Fingern und Zehen	Geschlossene Frakturen von Becken / Röhrenknochen, Verstauchung großer Gelenke	dislozierte geschlossene oder einfache offene Röhrenknochenfrakturen, dislozierte Beckenfraktur, mehrfache Hand- / Fußfrakturen, Luxation großer Gefäße, Verletzung von großen Extremitätennerven / -gefäßen	Mehrfache Röhrenknochenfrakturen, Gliedmaßenamputation	Mehrfache offene Röhrenknochenfrakturen

Tabelle 1: Injury-Severity-Score (ISS) nach Baker et al. (1974).

1.2.2.2 Der PTS-Score

Der erstmals von Oestern beschriebene Polytraumaschlüssel (PTS) berücksichtigt in seiner aktuellen Form alle Verletzungen, die Glasgow Coma Scale (GCS), das Basendefizit und den Quotienten aus arterieller Sauerstoffsättigung (PaO_2) und der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (FiO_2) bei stationärer Aufnahme des Patienten [145,143,142]. Die Sensitivität des PTS liegt bei 83,1 %, die Spezifität bei 83,7 % [29,184].

Variable	Punkte	Variable	Punkte
Schädel		Thorax	
GCS 9-12	2	Sternum / Rippenfrakturen	1
GCS 6-8	4	Rippenserienfraktur	4
GCS 3-5	16	Rippenserienfraktur bds.	10
Mittelgesichtsfraktur	1	Pneumothorax	2
Schwere Mittelgesichtsfraktur	2	Hämatothorax	1
		Lungenkontusion	3
		Lungenkontusion bds.	5
Abdomen		Aortenruptur	16
Milzruptur	5		
Leberruptur	8	Becken	
Leberruptur ausgedehnt	10	Beckenfraktur einfach	2
Pankreas	8	Beckenfraktur kombiniert	5
Magen, Darm, Niere, Mesenterium	5	Becken- / Urogenitalverletzung	8
		Beckenquetschung	12
Extremitäten / -frakturen		Wirbelbruch	2
Oberschenkeltrümmerfraktur	8	Wirbelbruch mit Querschnitt	8
Oberschenkelfraktur	6		
Oberarm, Schulter	4	Alter [Jahre]	
Unterschenkelfraktur	2	0-39	0
Patella, OSG, Unterarm, Knieband	1	40-54	1
Gefäßverletzung Oberschenkel	5	55-59	2
Gefäßverletzung Oberarm	4	60-64	3
Gefäßverletzung Unterschenkel/ -arm	3	65-69	5
2° und 3° offene Fraktur	2	70-74	8
Weichteilverletzung	1	≥ 75	17
$p_a\text{O}_2 / F_i\text{O}_2$		„base excess“	
≤ 50	22	≤ -16	26
50-99	12	-14 bis -15,9	20
100-149	8	-12 bis -13,9	14
150-199	5	-10 bis -11,9	9
200-249	3	-08 bis -09,8	5
250-299	2	-06 bis -07,9	3
300-349	1	-04 bis -05,9	1
> 350	0	> -3,9	0

PTS revidiert = Summe der Punktwerte der Einzelverletzungen

Tabelle 2: Polytrauma-Schlüssel (PTS) nach Oestern et al. (1991).

1.2.2.3 Der APACHE II- und APACHE III-Score

Das von Knaus und Mitarbeitern 1981 publizierte APACHE-Scoresystem (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation) zählt zu den Standardverfahren einer Beurteilung von Intensivpatienten [72,95,108,103,106,146,161]. Der APACHE II-Score unterschätzt jedoch die zu erwartende Mortalität, da polytraumatisierte Patienten meist jung und gesund sind und daher initial nicht als schwer krank klassifiziert werden [105]. Als Weiterentwicklung stellt Knaus 1991 den APACHE III-Score vor [107]. Die Sensitivität des APACHE III liegt bei 50,4 %, die Spezifität bei 96,3 % [179]. Zimmermann fand eine gute Vorhersagbarkeit mit Hilfe des APACHE III-Scores, bezogen auf den Krankheitsverlauf bei Patienten mit Multiorganversagen beziehungsweise MODS [209,210].

1.2.3 Immunreaktion nach Polytrauma

Das menschliche Immunsystem lässt sich in zwei zentrale Komponenten unterteilen, das spezifische zelluläre und humorale Abwehrsystem sowie das unspezifische Abwehrsystem. Die zellvermittelte Immunantwort reguliert über T-Helfer-Lymphozyten (T4-Zellen, CD4⁺-Zellen) die Proliferation und Differenzierung von T-Lymphozyten (T8-Zellen, CD8⁺-Zellen), die spezifische zelluläre Abwehr, und B-Lymphozyten die spezifische humorale Abwehr. Die Stimulation dieser Zellen führt zur Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten (NK-Zellen) und induziert die Reifung von B-Lymphozyten zu Immunglobulin produzierenden Plasmazellen. Das unspezifische Immunsystem besteht aus Makrophagen, teils gewebsständig und gewebstypisch (z.B. Alveolarmakrophagen) und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN), die bei der Elimination eindringender Mikroorganismen eine große Rolle spielen. Daneben existiert eine Vielzahl von Proteinen, die lokal auto- und parakrin, sowie im Rahmen der Immunreaktion die Aufgabe eines immunologischen Signalübermittlers übernehmen (z.B. Zytokine). Insbesondere initiale immunologische Frühveränderungen nach schwerwiegenden Traumen gelten als die entscheidenden pathophysiologischen Induktoren späterer Komplikationen [74]. Deshalb ergibt sich aus intensivmedizinischer Sicht die Notwendigkeit der möglichst frühzeitigen umfassenden Versorgung aller knöchernen Verletzungen und Weichteilläsionen, um frühzeitige Triggermechanismen einer inflammatorischen Reaktion zu vermeiden, mit dem Ziel einer Stabilisierung der körpereigenen

Abwehrmechanismen [135,152]. Zerstörte Haut- und Schleimhautbarrieren lassen Mikroorganismen nahezu ungehindert in den Organismus eindringen, die zunächst lokal begrenzt eine Infektion mit einer lokalen begrenzten Immunreaktion verursachen.

Übersteigen die lokalen inflammatorischen Prozesse die gleichzeitig aktivierten körpereigenen lokalen immunologischen Defensivsysteme, so kann es zu einer überschießenden sich systemisch ausbreitenden Entzündungsreaktion kommen. Diese kann sich, wenn sie sich nicht immunologisch oder therapeutisch begrenzen lässt, zu einer überschießenden Entzündungsreaktion entwickeln, die dann zu teils irreversiblen, noxenfernen Organfunktionsstörungen führen kann [80]. Eine Störung der Granulozytenfunktion ist bereits in der Frühphase, das heißt wenige Stunden nach einem Trauma, nachweisbar. Es kommt zur Einschränkung der Chemotaxis, der Adhärenz, der Phagozytoseleistung und des oxidativen Burst (Respiratory Burst) als Zeichen einer posttraumatisch beeinträchtigten unspezifischen Immunfunktion [3,6].

Parallel führen zerstörte Endothelstrukturen über eine direkte Aktivierung immunkompetenter Zellen und über Mediatoren aktivierte Endothelzellen zu proteolytischen Prozessen am Gefäßendothel [167,170]. Neben den humoralen Regelkreisen des Immunsystems stehen das Komplementsystem, die Arachidonsäure-Kaskade, das System der Kontaktaktivierung, die Funktionen des Gefäßendothels sowie das Gerinnungs- und das Fibrinolysesystem bei einer generalisierten inflammatorischen Reaktion als gleichwertige Faktoren nebeneinander [11,71,102,160].

1.2.4 Multiorganversagen nach Polytrauma

In der posttraumatischen Phase kann es infolge des Traumas zu einer unkontrolliert gesteigerten Immunreaktion kommen, die das gesamte Immunsystem umfassen kann und in eine partielle oder subtotale immunologische Anergie münden kann. Die diesem klinischen Zustandsbild zu Grunde liegende, unterschiedlich ausgeprägte Immunsuppression wird häufig zusätzlich durch das Auftreten von Infektionen kompliziert [121,197,199]. Die Prognose eines polytraumatisierten Patienten wird deshalb entscheidend beeinflusst durch die mögliche Entwicklung von Funktionseinschränkungen einzelner Organsysteme in der posttraumatischen Phase. Diese können rasch progredient in einem therapeutisch nicht beherrschbaren Multiorganversagen enden. Sie können sich aber auch mit minder schwerer Ausprägung lokal begrenzen auf ein oder zwei

Organe, und der Patient bleibt bei vergleichbarer Ausgangslage von einem Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom (MODS) verschont [92].

Von Tilney 1973 erstmals als sequentielles Versagen von mehreren, primär unbeteiligten Organsystemen nach Ruptur eines Aortenaneurysmas beschrieben [185], gingen alle im Folgenden aufgeführten Erklärungsmodelle des Multiorganversagens von einer stattgehabten Infektion als Auslöser dieser meist letalen Reaktionsabfolge aus [8,48,58,70]. Erst als in weiteren Studien an polytraumatisierten Patienten mit Multiorganversagen weder ein Infektionsherd noch ein Erreger nachgewiesen werden konnte, kamen Zweifel an der infektiionsbedingten Pathogenese des Multiorganversagens auf [60,76]. Seitdem gilt auch das stattgehabte Trauma selbst in Fällen ohne Infektionsherd als potentieller Auslöser einer systemischen, autodestruktiven Entzündungsreaktion [24,54,62].

Um die Vielfalt an Begriffen für eine systemische autodestruktive Entzündungsreaktion zu begrenzen, wurde in einer Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians (ACCP), zusammen mit der Society of Critical Care Medicine (SCCM) 1991 der Begriff „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS) für eine systemische Entzündungsreaktion festgelegt [26,13].

Analog zur Begriffsbestimmung des SIRS wurde aus der Vielzahl der Umschreibungen für Organfunktionsstörungen und Organversagen von Bone 1992 der Begriff „Multi Organ Dysfunction Syndrome“ (MODS) vorgeschlagen [27].

Seitdem verwendet man den Begriff des „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS) für eine systemische Entzündungsreaktion unabhängig von ihrer Ursache. Das SIRS ist durch das Vorhandensein bestimmter klinischer und laborchemischer Parameter definiert und kann nicht nur durch eine unkontrollierte Infektion, sondern auch durch Schock, Trauma, Verbrennungen, Hypoxie oder durch eine Pankreatitis verursacht werden [13,27]. Alle humoralen und zellulären Abwehrmechanismen sind aktiviert und unterscheiden sich nur in ihrer Gewichtung. Im Rahmen der lokalen Entzündungsreaktion werden für lokale Prozesse bestimmte proinflammatorische Mediatoren freigesetzt, die simultan autoaggressiv-toxisch auf den eigenen Organismus wirken [12]. Überschreitet die initiale Freisetzung dieser Mediatoren ein bestimmtes Maß, können die reflektorisch aktivierten, regulativ wirkenden Defensivsysteme nur noch zu schwach oder zu spät dem sich ausweitenden Entzündungsgeschehen entgegenwirken. So kommt es durch das bestehende Überangebot an freigesetzten proinflammatorischen

Mediatoren (Akute Phase Proteine), Proteasen (Elastase) und reaktiven Sauerstoffmetaboliten zu einer ungebremsten, sich selbst unterhaltenden, systemischen Entzündungsreaktion mit Permeabilitätsstörungen an den Membranen der Organe und daraus resultierenden progredienten Organfunktionsstörungen [15,50]. Somit ist SIRS und MODS nach schweren Verletzungen zum Teil als Autoimmunreaktion auf das vorangegangene Trauma zu verstehen.

Für die Entwicklung eines Multiorganversagens zeigt sich bei einer schweren Mehrfachverletzung oft ein klinisch-phasenhafter Verlauf [186]:

- I. Mehrfachverletzung mit traumatischer Zerstörung von Weichteilgewebe und der Entwicklung eines hämorrhagisch-traumatischen Schockes mit sekundärem Auftreten eines Ischämie- und Reperfusionssyndroms (I/R-Syndrom).
- II. Hypererge Phase mit Ausbildung einer akuten (a)bakteriellen Entzündungsreaktion (Acute Inflammatory Response) unter Rekrutierung aller Komponenten des humoralen und zellulären Immunsystems, initial lokalisiert und kompensiert.
- III. Im Falle einer Dekompensation der Defensivsysteme die systemische Ausbreitung der Entzündungsreaktion mit Entwicklung eines posttraumatischen Immundefektsyndroms, welches mit einem erhöhten Infektionsrisiko verbunden ist.
- IV. Auftreten eines hyperdynamen Zustandsbildes aufgrund einer (a)bakteriellen Sepsis und/oder Funktionsstörungen einzelner Organe.
- V. Septisches Multiorganversagen.

1.2.5 Epidemiologie des Multiorganversagens nach Polytrauma

Die Inzidenz des MODS steigt trotz ständiger Weiterentwicklungen in der Intensivmedizin weiter an und liegt für einzelne Studien bei bis zu 42 % für polytraumatisierte Patienten [135]. Die Letalität ist abhängig von der Zahl der betroffenen Organe und der Dauer des Organversagens. Sie liegt bei zwei betroffenen Organen etwa bei 60 % und für vier betroffene Organe bei 100 % [15,114].

1.3 Bedeutung der Gerinnung und Fibrinolyse im Entzündungsgeschehen

1.3.1 Einführung

Konzentrierten sich frühere Vorstellungen der Entstehung eines SIRS auf Mikroorganismen und ihrer Pathogenität und Virulenz, erachtet man heute die inflammatorisch-immunologische Komponente der Wirtsreaktion als wesentlichen Mechanismus eines septischen Geschehens. Es kommt zu einer mediatorinduzierten, unkontrollierten systemischen Hyperinflammation durch lokal autoaggressive Komponenten der inflammatorischen Reaktion, die die simultan einsetzende anti-inflammatorische Gegenregulationen überfordern. Diese Störung der inflammatorisch-antiinflammatorischen Balance ist nach heutigem Verständnis als Ursache für akute, infektionsortferne Organfunktionsstörungen anzusehen.

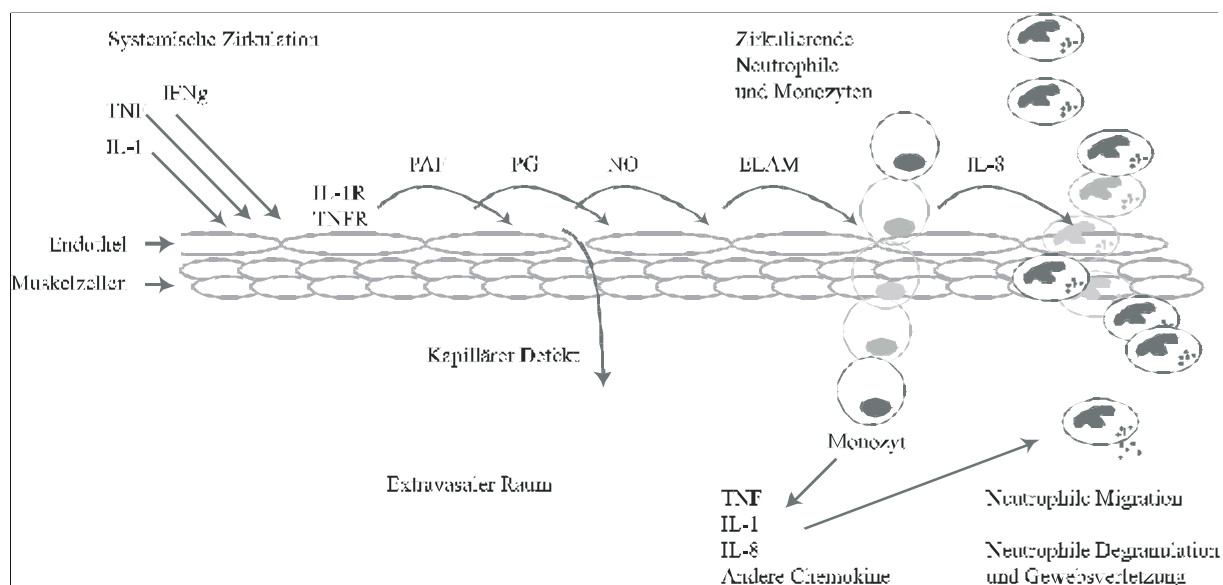


Abbildung 1: Darstellung der Entzündungsreaktion am Endothel.

Daneben wird den Funktionen des Gefäßendothels und seiner Verknüpfungen mit den immunologischen Regelkreisen eine zunehmende Bedeutung auch im unmittelbaren posttraumatischen Entzündungsgeschehen zugewiesen [160]. Sowohl zerstörte Endothelstrukturen als auch von immunkompetenten Zellen direkt und/oder durch Mediatoren

gleichwertig neben den anderen übergreifenden humoralen Funktionskreisen: dem Komplementsystem, der Arachidonsäure-Kaskade und dem System der Kontakt-aktivierung [71,102,89].

1.3.2 Rolle des Gerinnungs- und Fibrinolysesystems im Entzündungsprozess

Neben der oben genannten Immunreaktion kommt es zusätzlich zur Aktivierung des Gerinnungs- und Fibrinolysesystems. Dies geschieht einerseits direkt über die Endothel- und Weichteilläsionen infolge des Traumas, andererseits vermittelt über die Mediatoren der ablaufenden Entzündungsreaktion [44]. Somit ist die Aktivierung des Immunsystems und des Gerinnungssystems voneinander abhängig und bedingt sich teilweise gegenseitig [57].

Klinisch imponieren diese Patienten durch einen Abfall der Thrombozytenzahl, einen Anstieg von Produkten des Fibrinogenabbaus (z.B. ein Anstieg der D-Dimer-Konzentration) und weiteren charakteristischen Merkmalen der disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC, Verbrauchskoagulopathie). Darüber hinaus zeigen septische Patienten Konzentrationsabfälle von aktiviertem Protein C (APC), Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor (TFPI) und Antithrombin III (AT III) [22,45].

TFPI, welches das für die Blutgerinnung wichtige Thrombin hemmt, ist hauptsächlich an Endothelzellen, aber auch an im Blut zirkulierenden Lipoproteinkomplexen und Thrombozyten gebunden. Die Freisetzung erfolgt nach Stimulation durch Thrombin und zeigt eine fibrinolytische und antiinflammatorische Wirkung durch eine Unterbrechung der Gerinnungskaskade an unterschiedlichen Stellen. TFPI bindet sich an Faktor Xa, Faktor VIIa und den Gewebefaktor und beeinflusst damit sowohl die intrinsischen als auch die extrinsischen Kaskaden der Gerinnung. Hieraus ergibt sich eine interessante therapeutische Option, die zur Zeit in klinischen Studien erprobt wird [94,22,45]. Bei einer Phase-II-Studie mit 210 septischen Patienten betrug die Mortalitätsrate bei Patienten mit Sepsis und Organdysfunktion in der Placebogruppe 38 % und bei den Patienten, die über 96 Stunden TFPI erhielten, 30 %. Das entspricht einer Reduktion der Mortalität (bei diesen Patienten) um etwa ein Viertel. Hinzu kommt, dass besonders die Patienten von TFPI profitierten, deren Sepsis besonders schwer verlief. So nutzte die Therapie besonders Patienten mit einem APACHE II-Score >20, Patienten mit akuter respiratorischer Insuffizienz (ARDS) zu Therapiebeginn und Patienten mit schweren

inflammatorischen Zeichen (IL-6 >1000 pg/ml). Diese Patienten wiesen in der Kontrollgruppe eine Mortalitätsrate von 62 % auf. Patienten mit einem IL-6-Spiegel von mehr als 1000 pg/ml, die mit dem Gewebefaktor-Inhibitor behandelt wurden, wiesen eine Mortalitätsrate von 41% auf und profitierten daher am meisten [183].

AT III ist ein Kofaktor des Heparins und ein AT III-Mangel zeigt sich als Heparinresistenz mit erhöhter Thromboseneigung. Niedrige AT III-Spiegel bei einer Verbrauchskoagulopathie und bei einer Sepsis gehen einher mit einer erhöhten Mortalität [204]. Hieraus resultiert die Annahme, dass sich durch exogene Zufuhr von AT III die Prognose der Patienten verbessern lässt. AT III vermittelt seinen antiinflammatorischen Effekt durch seine Bindung an das Endothel und dortige Regulation der Prostacyclinfreisetzung. Jedoch muss erwähnt werden, dass Heparin, welches während der Intensivtherapie den Patienten oft verabreicht wird, die Bindung von AT III an die Endothelzellen und damit die antiinflammatorische Wirkung inhibiert. Fourrier et al. konnten in einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie bei Patienten mit dokumentiertem septischen Schock und DIC zeigen, dass bei Patienten, die AT III (90 – 120 I.E/kg KG Startdosis, gefolgt von 90 – 120 I.E./kg KG/d über 4 Tage) erhielten, die AT III-Spiegel rasch und dauerhaft auf Normalwerte hin korrigiert werden konnten. Die Dauer der DIC ließ sich durch AT III-Gabe signifikant reduzieren. 64 % der Patienten wurden dabei am Tag 2 von DIC kuriert und 71 % am Behandlungsende. In der Placebogruppe lagen die entsprechenden Ergebnisse bei 11 % und 33 %. Die Unterschiede waren signifikant ($p=0,01$ bzw. $0,05$). Die Mortalität auf der Intensivstation wurde durch AT III um 44 % reduziert, die Reduktion war allerdings nicht signifikant. Der Bedarf an Blutbestandteilen unterschied sich nicht zwischen beiden Gruppen, unerwünschte Wirkungen wurden unter der Therapie nicht beobachtet. Das zirkulierende Protein C und die Protein S-Spiegel wurden durch die AT III-Gabe nicht beeinflusst. Als Fazit dieser Studie lässt sich feststellen, dass AT III-Konzentrate in hoher Dosierung wahrscheinlich in der Lage sind, die durch Sepsis induzierte DIC während eines septischen Schocks zu verbessern [66,67].

Protein C, in der Leber produziert, wird aktiviert durch einen Komplex aus Thrombomodulin (TM), Endothelzellen und Thrombin. Am Endothel wird die Proteinaktivierung von Protein C zu APC induziert durch die Hemmung der Fibrinolyse. Dieser Vorgang wird vermittelt durch PAI-1 [18,94]. APC, ein Hemmstoff der Thrombinsynthese, zeigt fibrinolytische und antiinflammatorische Aktivität und ist durch niedrige Plasmaspiegel,

verursacht durch einen gesteigerten Verbrauch, bei septischen Patienten gekennzeichnet [64]. Patienten im septischen Schock zeigten die niedrigsten Protein C-Plasmaspiegel und eine Mortalität bis zu 100 % [129]. Der Abfall der Protein C-Konzentration im Plasma beruht auf einer gesteigerten Umwandlung in seine aktive Form dem APC und einer verminderten hepatischen Synthese. Klinische Studien erproben zur Zeit eine immunmodulatorische Therapie der Sepsis mit APC [18]. Eine Substitutionstherapie mit aktiviertem Protein C könnte in der Lage sein, die Prognose von Patienten mit Sepsis und ähnlichen Erkrankungen zu verbessern. In einer Placebo-kontrollierten Phase II-Studie bei Patienten mit schwerer Sepsis senkte eine Infusion mit rekombinantem humanem APC (aktiviertem Drotrecogin alpha) dosisabhängig die Serumspiegel von D-Dimer, als Marker für eine Koagulopathie, sowie IL-6, als Marker für eine ablaufende Entzündungsreaktion [17]. In der PROWESS-Studie erhielten Patienten mit einer schweren Sepsis, begleitet von systemischen entzündlichen Prozessen und Organversagen, aktiviertes Drotrecogin alpha (24 µg/kg/h) oder Placebo. Die Infusionsdauer betrug 96 Stunden. Der prospektiv definierte Endpunkt war der Tod der Patienten nach 28 Tagen. Sämtliche unerwünschte Wirkungen und veränderte Laborparameter wurden dokumentiert. Weiterhin wurde auf neutralisierende Antikörper gegen APC untersucht. Insgesamt erhielten 1690 Patienten eine Infusion, davon 840 Placebo und 850 Verum. Die Mortalitätsrate betrug 30,8 % mit Placebo und 24,7 % in der Verumgruppe. Unter Verum litten die Patienten häufiger an schweren Blutungen als unter Placebo (3,5 % vs. 2 %) [18].

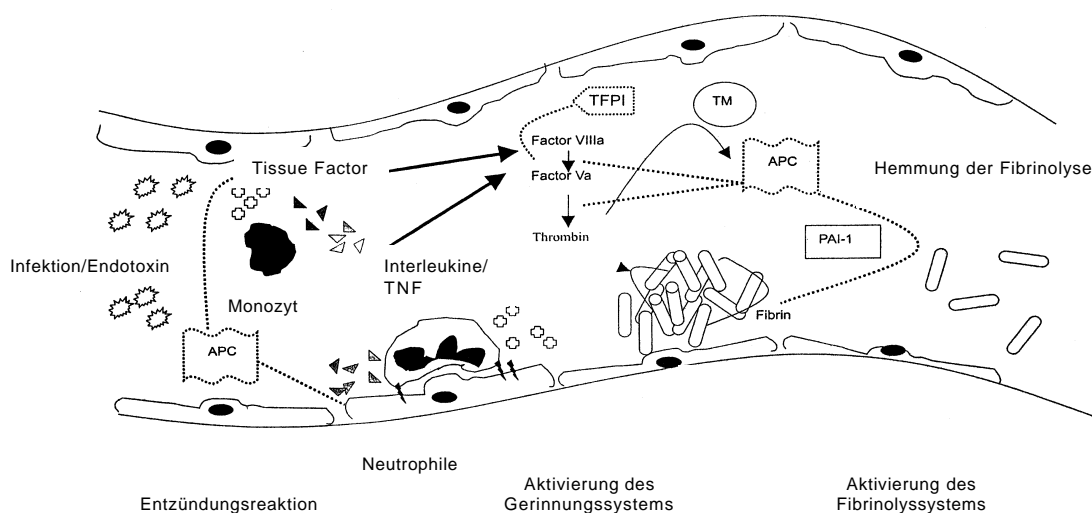


Abbildung 2: Verbindung der Entzündungsreaktion mit dem Gerinnungssystem nach Jacobi [94].

Die Serinprotease PAI-1, der wichtigste Regulator des endogenen fibrinolytischen Systems, ist als einziger Plasminogen-Aktivator-Inhibitor direkt an Tissue-Plasminogen-Aktivator (t-Pa) und an die Urokinase gebunden und hemmt darüber die Fibrinolyse [139,21]. Eine gesteigerte Transkription des PAI-1-Proteins erfolgt bereits direkt auf genetischer Ebene, denn die Expression von PAI-1 wird teilweise durch proinflammatorische Zytokine positiv beeinflusst und auch seine Transkription erfolgt zum Teil über identische Faktoren [162]. Erhöhte TNF- α und IL-1 β -Spiegel im Plasma beeinflussen die Freisetzung von PAI-1 aus Endothelzellen, Thrombozyten und Leberparenchymzellen direkt [44,189].

Auf eine initial gesteigerte Fibrinolyse unmittelbar nach dem Trauma, vermittelt durch eine erhöhte t-Pa-Aktivität, folgt reflektorisch eine systemische Fibrinolysehemmung aufgrund einer gesteigerten PAI-1-Synthese [34,205]. Kommt es durch oben genannte Faktoren nach einer schweren Verletzung zu einer initial gesteigerten Hemmung der lokalen Fibrinolyse, folgen lokale Mikrozirkulationsstörungen mit einer sich verstärkenden Hypoxie, die parenchymalen Läsionen aggravieren mit der Folge der exazerbierenden Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren [87,125,127,202].

1.3.3 Der PAI-1-Genpolymorphismus

Das Ausmaß einer Mediatorenfreisetzung ist nach einer vergleichbar schweren Mehrfachverletzung bei Patienten nicht einheitlich [43] und scheint genetisch beeinflusst. Die unterschiedliche Ausprägung eines Entzündungsprozesses kann auf genetische Unterschiede einzelner Zytokingene und deren Einflussnahme auf Synthese und Freisetzung der Zytokine gründen [5]. Eine unterschiedliche Ausprägung des Genotyps eines Zytokingens kann mit einer erhöhten oder verminderten Synthese und Freisetzung des entsprechenden Zytokins einhergehen [84,90,169]. In Vergleichsstudien konnten auffällige Genotypverteilungen bei verschiedenen Erkrankungen nachgewiesen werden. Genpolymorphismen der Zytokingene Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β) und der Serinprotease Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) zeigten auffällige Genotypverteilungen für einzelne Erkrankungen und Krankheitsverläufe [36,55,74,97,128,153,178]. Des Weiteren konnten für die jeweiligen Genotypen funktionelle Assoziationen zur Höhe der Plasmaspiegel, zur Aus-

prägung eines SIRS, zu Organfunktionsstörungen und der Prognose polytraumatisierter und septischer Patienten festgestellt werden [55].

Der PAI-1-Genlocus ist auf dem Chromosom 7 (q21.3-q22) lokalisiert. Bisher sind für das PAI-1-Gen drei Polymorphismen beschrieben, die Auffälligkeiten in ihrer Verteilung bei verschiedenen Erkrankungen zeigen. Neben einem $(CA)_n$ -Box-Polymorphismus im dritten Intron findet sich ein Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) mit einer Hind III-Schnittstelle in der unmittelbaren Nähe des 3'-Endes der PAI-1-Promotorregion [159]. Daneben [177,211] gibt es einen Insertions-/Deletions-Polymorphismus mit einer variablen Guanosinmolekülzahl an der Position -675 innerhalb der PAI-1-Promotorregion [120,177,211]. Dieser Zwei-Allel-Polymorphismus enthält je nach Ausprägung ein Guanosinquantett (4G) oder ein Guanosinquantett (5G) und zeigt auffällige Genotypverteilungen bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zu PAI-1-Plasmaspiegeln [120,177,211].

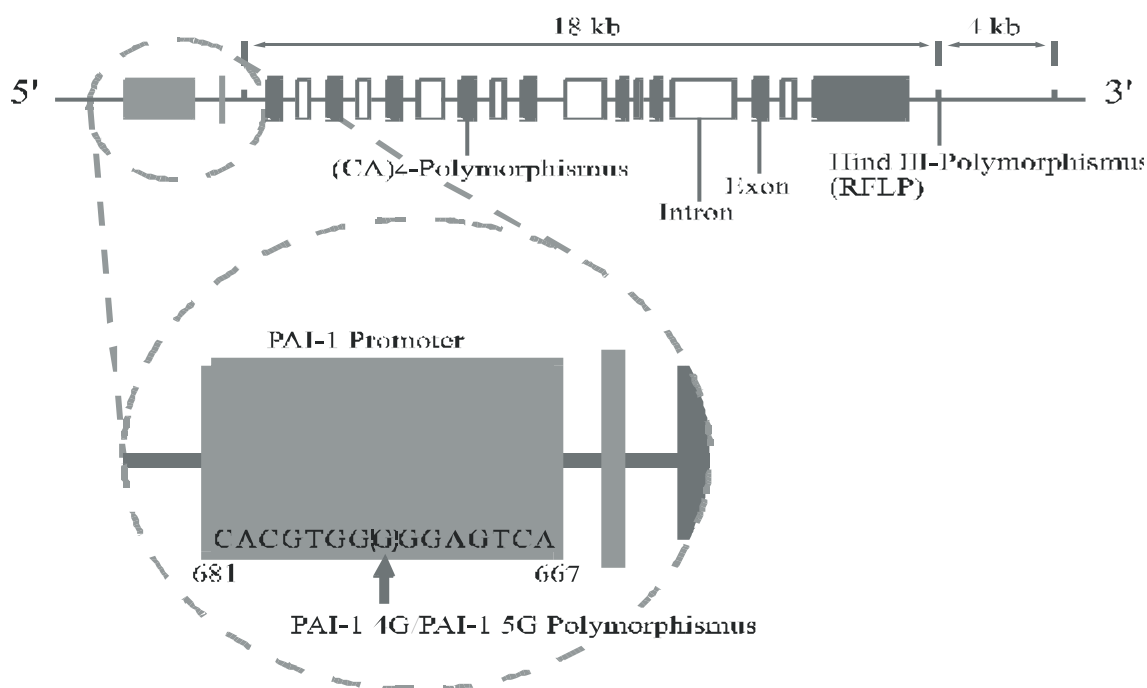


Abbildung 3: Schematische Darstellung des PAI-1-Gens.

1.4 Fragestellung

Die Interaktionen der Entzündungsreaktion mit dem Gerinnungs-/Fibrinolyse-System zeigt die Komplexität der Vorgänge nach schwerer Mehrfachverletzung auf. Es erscheint schwierig, Faktoren dieser Systeme als kausale Ursachen in die Entstehung von SIRS und MODS hinsichtlich ihres Stellenwertes einzugliedern. Der auftretenden, alle Systeme umfassenden Immunsuppression nach einem Polytrauma muss sicherlich in diesem Zusammenhang eine große Beachtung geschenkt werden. Im Gegensatz zu augenscheinlichen Verletzungen, Organläsionen und Organdysfunktionen bei polytraumatisierten Patienten und Einschränkungen des Gerinnungssystems (Verbrauchskoagulopathie) ist eine Dekompensation (Verbrauchsimmunopathie) des Immunsystems zur Zeit noch nicht kausal therapierbar. Bevor eine Prävention des SIRS und MODS gelingen kann, ist es notwendig, für die betroffenen Patienten Risikofaktoren zu erfassen und ein individuelles Risikoprofil zu erstellen.

Ziel der Arbeit war es, durch eine engmaschige Erfassung der Plasmaspiegel von IL-1 β , TNF- α sowie PAI-1, einer Genotypisierung der Patienten hinsichtlich des PAI-1-Promoter (-675) Genpolymorphismus und der Erhebung umfangreicher klinischer Daten festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen diesen Parametern und dem klinischen Verlauf besonders in der frühen Phase nach einem Polytrauma gibt. Bezüglich dieser Überlegungen ergeben sich folgende Fragen:

- I. Besteht eine Korrelation zwischen dem einzelnen PAI-1-Genotyp und dem individuellen Krankheitsverlauf eines Patienten?
- II. Besteht ein Zusammenhang zwischen den Plasmaspiegeln von TNF- α , IL-1 β und PAI-1 und den einzelnen PAI-1-Genotypen?
- III. Besteht eine Assoziation zwischen einzelnen PAI-1-Genotypen und dem Schweregrad des SIRS bzw. MODS eines einzelnen Patienten?

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

In die prospektive, von der Ethikkommission genehmigte Studie wurden im Zeitraum vom 1. März 1997 bis zum 31. Dezember 1999 insgesamt 65 polytraumatisierte Patienten einbezogen. Die einzelnen Patienten wurden während ihrer Behandlung auf der Operativen Intensivstation der Abteilung Anaesthesiologie, Intensivmedizin, Schmerztherapie des Universitätsklinikums Gießen und darüber hinaus an bis zu 28 Tagen nach dem Unfall untersucht.

Entsprechend der in der Einleitung erwähnten Definitionen für Polytrauma, SIRS und MODS wurden die Daten der Patienten erfasst. Anschließend erfolgte die Klassifizierung mit Hilfe des ISS-Scores, des PTS-Schlüssels und des APACHE III-Scores zur Beurteilung der Patienten. Weiterhin wurden Rettungsmittel und Rettungszeit dokumentiert. Die Erfassung der Vitalparameter (Hämodynamik, Respiration, laborchemische Daten) geschah mit Hilfe des EDV-gestützten Patienten-Daten-Management-Systems ICU-Data.

Als Einschlusskriterien wurden festgelegt:

- I. Vorliegen einer Einverständniserklärung
- II. Diagnose Polytrauma
- III. PTS-Wert ≥ 30 und/oder ISS-Wert ≥ 10
- IV. Alter ≥ 18 Jahre und ≤ 65 Jahre
- V. Aufnahme des Patienten auf die Operative Intensivstation ≤ 12 Stunden nach dem Trauma

Als Ausschlusskriterien galten:

- I. Schwere Einzelverletzungen wie Wirbelsäulenverletzungen und Beckenverletzungen (Barytraumen)
- II. Patienten mit anzunehmendem Hirntod und funktionierendem Kreislauf
- III. Massive ZNS-Schädigung (Patienten mit im Vordergrund stehendem operativ zu versorgendem Schädel-Hirn-Trauma, SHT II°-III°)
- IV. Reanimation nach Herzstillstand oder schwerer kardiogener Schock
- V. Verabreichung steroidaler und nicht-steroidaler Antiphlogistika

- VI. Schwangere Frauen und Frauen in der Stillzeit
- VII. Gleichzeitige Teilnahme an einer anderen Studie
- VIII. Patienten mit Verbrennungen aller Stadien
- IX. Versterben des Patienten innerhalb der ersten drei Tage auf der Operativen Intensivstation
- X. Patienten mit vorbestehenden malignen, hämatologischen oder einer anderen, das Immunsystem schwer verändernden Grunderkrankung

2.2 Messzeitraum und Behandlung der Patienten

Beginnend mit dem Aufnahmetag wurde die Dokumentation der Patienten entweder bis zum 28. Tag fortgeführt oder bis zum Zeitpunkt des frühzeitigen Endes der stationären Therapie. Tag 1 war der Aufnahmetag, wobei sich die Probenentnahme abhängig vom Studieneinschluss zeitlich variabel gestaltete. An den Tagen 2 bis 14 sowie Tag 21 und 28 wurde jeweils um 8 Uhr morgens das Untersuchungsmaterial entnommen. Die Routinelaborparameter wurden täglich ebenfalls um 8 Uhr morgens bestimmt. Im Anschluss an das vierwöchige Intervall wurde die Krankengeschichte der überlebenden Patienten bis zum Abschluss der stationären Therapie dokumentiert.

2.2.1 Monitoring

Bei allen Patienten erfolgte kontinuierlich die auf Intensivstationen übliche Überwachung. Im Einzelnen beinhaltete das Monitoring eine EKG-, Puls- sowie Sauerstoffsättigungsüberwachung und eine Messung des arteriellen Blutdrucks. Weiterhin wurde die Körpertemperatur rektal registriert und die tägliche Urinausscheidung gemessen, um eine Flüssigkeitsgesamtbilanz zu erstellen. War die Erfassung weiterer hämodynamischer Parameter notwendig, wurde ein Pulmonalkatheter platziert. Zudem waren alle Patienten der Studie mit einem mehrlumigen zentralen Venenkatheter sowie einer Magen- oder Duodenalsonde versorgt und mindestens während der ersten Behandlungstage kontrolliert beatmet. Alle Patienten unterlagen einem weitgehend standardisierten Therapieregime der Intensivstation der Abteilung Anaesthesiologie, Intensivmedizin, Schmerztherapie des Universitätsklinikums Gießen. Bedarfsadaptiert an die individuelle

Situation des einzelnen Patienten wurden mindestens einmal täglich bei den Patienten routinemäßig Laboruntersuchungen (Elektrolyte, Gerinnung, Blutbild, Blutzucker, Leberwerte, Nierenretentionswerte, Gesamteiweiß) und Blutgasanalysen vorgenommen. Das mikrobiologische Screening beinhaltete Bronchial- und Trachealsekret, Urinkulturen sowie Abstriche bei offenen Wunden oder Verdacht einer Wundinfektion. Die regelmäßige Untersuchung von entfernten intravasalen Kathetern wurde ergänzt durch die Abnahme von venösem Blut für Blutkulturen. Diese wurden, bei klinischem Verdacht auf eine septische Reaktion, zu Beginn eines Fieberanstieges auf über 38,5°C gewonnen.

2.2.2 Intensivmedizinische Behandlung

Für alle Patienten der Studie kamen bis zur endgültigen Entwöhnung von der maschinellen Beatmung druckkontrollierte und druckkontrolliert assistierende Beatmungsverfahren zur Anwendung. Hierbei wurde immer ein PaO_2 zwischen 100 und 150 mmHg und ein PaCO_2 zwischen 38 und 48 mmHg angestrebt. Die Heparindosierung wurde nach der partiellen Thromboplastinzeit (PTT) eingestellt und im Normalfall in einer Dosierung von 125-500 I.E./h kontinuierlich infundiert. Adrenalin und/oder Noradrenalin wurden bei einem systemischen vaskulären Widerstand (SVR) unter 700 $\text{dyn} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{cm}^{-5}$ und einem mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) unter 60 mmHg appliziert. Die Therapie mit Antibiotika war bei Aufnahme auf die Intensivstation zunächst rational und wurde in Folge den Ergebnissen des täglichen mikrobiologischen Monitorings angepasst. Die Gabe von homologen Erythrozytenkonzentraten erfolgte bedarfsadaptiert, in der Regel bei einem Hb-Wert <7 g/l. Die Beatmungs-, Ernährungs- und Infusionstherapie wurde durch die behandelnden Ärzte bestimmt, die nicht an der Studie beteiligt waren. Eine kontinuierliche veno-venöse Hämodiafiltration (CVVHDF) wurde bei Patienten mit einem akuten Nierenversagen durchgeführt, wenn trotz intensiver diuretischer Therapie mit Schleifendiuretika die Retentionswerte und die Urinausscheidung folgende Grenzen überschritten: Kreatinin im Serum >3 mg/dl, Harnstoff im Serum >250 mg/dl, Urinausscheidung <20 ml/h.

2.2.3 Operationen

Die operative Behandlung erfolgte unter Berücksichtigung des Allgemeinzustandes zum frühest möglichen Zeitpunkt. Das chirurgische Management war bei allen Patienten vergleichbar. Die durchgeführten Operationen wurden im Einzelnen dokumentiert.

2.2.4 Kontrolle der Organsysteme

Für die intensivmedizinische Behandlung sowie für die Dokumentation während der Studie wurden sämtliche Organsysteme engmaschig überwacht. Dabei wurde auf folgende Parameter geachtet:

- I. **Herz-Kreislauf-System:** Herzfrequenz, systemischer Blutdruck (syst., diast., MAP), zentraler Venendruck, Herzzeitvolumen, Cardiac Index, pulmonalarterieller Druck, pulmonalkapillärer Verschlussdruck, systemischer Widerstand, pulmonaler Widerstand, arteriovenöse Sauerstoffdruckdifferenz.
- II. **Lunge und Beatmung:** arterielle Blutgase: Sauerstoffpartialdruck (PaO_2), Kohlendioxidpartialdruck (PaCO_2), pH-Wert, Base Excess, arterielle Sauerstoffsättigung, gemischtvenöser Sauerstoffpartialdruck (PvO_2), gemischtvenöser Kohlendioxidpartialdruck (PvCO_2), gemischtvenöse O_2 -Sättigung, Röntgenthorax, Atemfrequenz, Atemminutenvolumen, Atemzeitverhältnis (I:E), inspiratorische Sauerstoffkonzentration (FiO_2), positiv endexpiratorischer Partialdruck (PEEP), statische Compliance, Resistance, Beatmungsdrucke.
- III. **Niere und Elektrolyte:** Urin- und Flüssigkeitsbilanz, Urin-Werte von Natrium, Kalium, Kalzium, Kreatinin und Harnstoff.
- IV. **Leber und Pankreas:** Serum-Werte für Bilirubin, Albumin, Cholinesterase, Glutamat-Oxalazetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Laktat-Dehydrogenase (LDH), Gamma-Glutamyl-Transferase (γ -GT), Kreatinkinase (CK), alkalische Phosphatase (APH), Amylase, Lipase.
- V. **Blutbild und Blutgerinnung:** Hämoglobin (Hb), Hämatokrit (Hk), Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Differentialblutbild, Thromboplastinzeit (TPZ, Quickwert), partielle Thromboplastinzeit (PTT), Plasmathrombinzeit (TZ), Fibrinogen, Antithrombin III (AT III).

- VI. **Infektiologische Parameter:** Mikrobiologisches Probenmaterial, C-reaktives Protein (CRP), Blutkulturen.

2.2.5 Die prospektive Beurteilung der klinischen Situation eines Patienten

Zu jedem Messzeitpunkt wurde der Patient klinisch auf Vorliegen von Infekt- oder Sepsiszeichen hin untersucht. SIRS wurde angenommen, wenn folgende, zuvor festgelegte Kriterien durch die behandelnden Ärzte am Krankenbett festgestellt wurden:

- I. Temperaturspitzen über 39°C in den letzten 24 Stunden.
- II. Zunahme des Volumenbedarfs, nicht erklärt durch andere Ereignisse (z.B. Operationen) mit den klinischen Zeichen der Ödembildung, Schrankenstörung und positive Flüssigkeitsbilanz (>1000ml).
- III. Kreislaufzentralisierung mit peripher kalten Extremitäten.
- IV. Klinische Zeichen beginnender Organfunktionsstörungen mit:
 - Verschlechterung des Gasaustausches,
 - Störung/Rückgang der Darmfunktion (Ileuszeichen, Zunahme des Magen- und Duodenalsondenrücklaufes, Abnahme/Fehlen der Peristaltik),
 - zunehmender Ikterus,
 - zunehmende Eintrübung und verminderte Ansprechbarkeit bei wachen Patienten.
- V. Insgesamt akute, nicht erklärbare Verschlechterung des Allgemeinzustandes nach klinischer Beurteilung.

Fakultativ:

- VI. Makroskopisch nachweisbare Eiter- oder suspekt eitrig aussehende Sekretion aus Wunden, eitrig aussehendes Trachealsekret.

Diese Beurteilung des Zustandes ergibt ein „klinisches Bild“ des Patienten, das letztlich viele Entscheidungen für den Patienten beeinflusst. In dieses Zustandsbild fließen Parameter wie Laborbefunde, bakteriologische Befunde, quantitative Erfassung des Permeabilitätsschadens (Messung des extravaskulären Lungenwassers) nicht ein. Diese „klinische SIRS-Diagnostik“ wurde zu jedem Messzeitpunkt unabhängig von der vorherigen Bewertung durchgeführt.

SIRS wurde postuliert, wenn eine mindestens 24 Stunden andauernde Reaktion des Organismus entsprechend der SIRS-Kriterien nachweisbar war, ohne dass gleichzeitig ein anderes Ereignis (Operation) stattgefunden hatte. Waren fünf der Kriterien zur Festlegung von SIRS erfüllt, wurde der Patient entsprechend der Definition klassifiziert.

Klinische Kriterien der Sepsis

1. Infektiöse Ätiologie der Inflammation
2. Mikrobiologisch dokumentierte Infektion oder Infektion nach klinischen Kriterien
3. Schwere inflammatorische Wirtsreaktion [mind. 2 Kriterien]
 - Fieber: Körperkerntemperatur $>38^{\circ}\text{C}$ oder Hypothermie: Körperkerntemperatur $<36^{\circ}\text{C}$
 - Tachykardie: Kammerfrequenz $>90/\text{min}$
 - Tachypnoe: >20 Atemzüge/min oder Hyperventilation: $\text{PaCO}_2 < 4,3 \text{ kPa}$ ($=33 \text{ mmHg}$)
 - Leukozytose $>12 \text{ G/l}$ oder Leukopenie $<4 \text{ G/l}$ oder Linksverschiebung im Differentialblutbild [unreife/Gesamtzahl der neutrophilen Granulozyten $>0,1$]
4. Zeichen der generalisierten Inflammation: akute infektionsferne Organdysfunktionen/-versagen [mind. 1 Kriterium]
 - Akute Enzephalopathie: reduzierte Vigilanz, Desorientierung, Unruhe, Delir (bei fehlender Beeinflussung durch psychotrope Pharmaka, endokrine oder metabolische Ursachen)
 - Arterielle Hypotension: systolischer Blutdruck zumindest 1 Stunde lang $<90 \text{ mmHg}$ bei einem zuvor normotensiven Patienten oder ein anhaltender Blutdruckabfall $>40 \text{ mmHg}$ gegenüber dem Ausgangsblutdruck

Bei Abwesenheit anderer Schockursachen

- Relative oder absolute Thrombozytopenie: Thrombozytenabfall $>30\%/24\text{h}$ oder Thrombozytenzahl $<100 \text{ G/l}$

Ohne Blutverluste als Ursache

- Arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 < 10 \text{ kPa}$ ($=75 \text{ mmHg}$) unter Atmung von Raumluft oder $\text{PaO}_2 [\text{kPa}]/\text{FiO}_2 < 33\text{kPa}$ [$=\text{PaO}_2\text{mmHg}/\text{FiO}_2 < 250 \text{ mmHg}$] unter Sauerstoffsupplementierung

Ohne manifeste pulmonale oder kardiale Erkrankung als Ursache

- Renale Dysfunktion/Oligurie: Urinausscheidung $<0,5 \text{ ml/kg KG}$ zumindest für 2 Stunden oder ein Abfall der Kreatininclearance
- Metabolische Azidose: negativer base excess $>5 \text{ mmol/l}$, der nicht anderweitig erklärbar ist oder eine Laktatkonzentration im Plasma außerhalb des Referenzbereiches des jeweiligen Labors

Klinische Kriterien des septischen Schocks

Kriterium 1, 2, 3 und 4 sowie

- Zumindest 2 Stunden lang bestehender systolischer arterieller Blutdruck $<90 \text{ mmHg}$ ohne Ansprechen auf eine adäquate Volumenexpansion oder Einsatz von α -adrenerg wirksamen Katecholaminen erforderlich, um den mittleren arteriellen Blutdruck auf $>60 \text{ mmHg}$ anzuheben und zu stabilisieren [nicht berücksichtigt wird eine Dopamindosis $<5 \mu\text{g/kg KG}$]

Tabelle 3: Klinische Kriterien der Sepsis und des septischen Schocks.

2.2.6 Die prospektive Sepsisklassifizierung der Patienten mit Hilfe von Score-systemen

Die prospektive Klassifizierung hinsichtlich SIRS und MODS entspricht dem allgemein üblichen Modus der Auswahl einer Reihe von als bedeutsam angesehenen Parametern mit Grenzwertangaben.

Das Ausmaß des Schweregrades der Erkrankung des einzelnen Patienten wurde anhand folgender Scores festgelegt:

- I. Multiple Organ Dysfunction Score (MODS) [122].
- II. Acute Physiology Chronic Health Evaluation III (APACHE III) [107].

Organ	Parameter	Einheit	0	1	2	3	4
Lunge	PO ₂ /F _i O ₂	-	> 300	226 - 300	151 - 225	76 - 150	≤ 75
Niere	Kreatinin	[μmol/l]	≤ 100	101 - 200	201 - 350	351 - 500	> 500
Leber	Bilirubin	[μmol/l]	≤ 20	21 - 60	61 - 120	121 - 240	> 240
Herz	Pressure adjusted Heart Rate	[l/min]	≤ 10	10,1 - 15	15,1 - 20	20,1 - 30	>30
Blut	Thrombozyten	[1.000/ml]	≤ 120	81 - 120	51 - 80	21 - 50	< 20
ZNS	GCS	-	15	13 - 14	10 - 12	9 - 7	< 6

Tabelle 4: MOD-Score nach Marshall (1994).

Punkte für laborchemische Daten und Vitalzeichen

Parameter	Einheit	33,5 - 33,9	34 - 34,9	35 - 35,9	36 - 39,9	< 40,0			
Rektaltemperatur	[°C]	13	8	2	0	4			
Art. Mitteldruck	[mmHg]	40 - 59 15	60 - 69 7	70 - 79 6	80 - 99 0	100 - 119 4	120 - 129 7	130 - 139 9	< 140 10
Herzfrequenz			< 39 8	40 - 49 5	50 - 99 0	100 - 109 1	110 - 119 5	120 - 139 7	> 140 13
Atemfrequenz		< 5 17	6 - 11 8	12 - 13 7	14 - 24 0	25 - 34 6	35 - 39 9	40 - 49 11	> 50 18
PO ₂	[mmHg]	< 49 15	50 - 69 5	70 - 79 2	> 80 0				
Kreatinin im Serum	[mg/dl]			< 0,4 3	0,5 - 1,4 0	1,5 - 1,94 4	< 1,95 7		
Kreatinin im Serum unter akutem Nierenversagen	[mg/dl]				0 - 1,4 0	> 1,5 10			
Hämatokrit	[%]			< 40,9 3	41 - 49 0	> 50 3			
Leukozyten	[1.000 mm ³]		< 1 19	1 - 2,9 5	3 - 19,9 0	20 - 24,9 1	> 25 5		
24h Sammelurin	[ml]	600 - 800 7	900 - 1499 5	1500 - 1999 4	2000 - 3999 0	> 4000 1			
Harnstoff	[mg/dl]				< 16,9 0	17 - 19 2	20 - 39 7	40 - 79 11	> 80 12
Na ²⁺ im Serum	[mmol/l]		< 119 3	120 - 134 2	134 - 154 0	> 155 4			
Albumin	[g/l]		< 19 11	20 - 24 6	25 - 44 0	> 45 4			
Bilirubin	[mg/dl]				< 1,9 0	2 - 2,9 5	3 - 4,9 6	5 - 7,9 8	> 8 16
Glucose	[mg/dl]	< 39 12	40 - 59 9	60 - 120 0	200 - 349 3	> 350 5			

Alterspunkte: Alter in Jahren Punkte

< 44	0
45 - 59	5
60 - 64	11
65 - 69	13
70 - 74	16
75 - 84	17
> 85	24

Chronische Punkte (wird bei Elektivoperationen nicht berücksichtigt):

Erkrankung	Punkte
AIDS	23
Leberversagen	16
Lymphome	13
Metastasierendes Ca	11
Leukämie	10
Immunsuppression	10
Leberzirrhose	04

Punkte für Abweichungen im Säure-Basenhaushalt:

PCO ₂ (mmHg) pH	< 25	25 – <30	30 - < 35	35 - < 40	40 - < 45	45 - < 50	50 - < 55	55 - < 60	> 60
< 7,15 7,15 - < 7,2	1 2						4		
7,2 - < 7,25 7,25 - < 7,3	9	6			3		2		
7,3 - < 7,35		0				1			
7,35 - < 7,4 7,4 - < 7,45	5					1			
7,45 - < 7,5		0	2						
7,5 - < 7,55 7,55 - < 7,6	3				12				
7,6 - < 7,65 > 7,65	0								

Tabelle 5: APACHE III-Score nach Knaus et al. (1991).

Der APACHE III-Score bewertet physiologische Parameter, Vorerkrankungen und das Alter des Patienten, der MODS-Score einzelne Organsysteme. Das Ausmaß der Abweichung von festgelegten Normwerten, definiert als Entgleisungen des physiologischen Gleichgewichts, wurde auf eine Gesamtpunktzahl aufsummiert. Die Berechnung jedes Zahlenwertes wurde für jeden Patienten täglich durchgeführt, da der MODS- wie auch der APACHE III-Score lediglich die Schwere, nicht jedoch die Dauer bzw. den zeitlichen Verlauf des Organversagens erfassen.

Zur Ermittlung der Zahlenwerte des APACHE III-Score wurde jeweils der schlechteste Wert für den einzelnen Parameter innerhalb von 24 Stunden berücksichtigt. Auf die Beurteilung des ZNS wurde verzichtet, da alle Patienten zumindest in den ersten Tagen analgosediert waren und beatmet werden mussten.

Auch beim MODS-Score wurde auf die Beurteilung des ZNS aus den genannten Gründen verzichtet. Zahlenwerte innerhalb der ersten 48 Stunden wurden nicht berücksichtigt, da dies reversible Veränderungen, die durch das initiale Ereignis oder ungenügende Erstversorgung bedingt sind, hätte reflektieren können [29]. Regel et al. (1991) wiesen zudem darauf hin, dass die Beurteilung von polytraumatisierten Patienten durch diesen Score ein verzerrtes Bild ergeben kann, da die Patienten unter anderem zur Sicherung der Atemwege und zur Vermeidung einer Aspiration, häufig initial intubiert

und beatmet werden [157]. Dies bedeutet nach Goris bereits ein Lungenversagen [73]. Ein MODS/MOV war demnach erst dann anzunehmen, wenn ein täglicher MODS-Score größer 6 Punkte über mehr als drei Tage erreicht wurde.

Da das MODS einen dynamischen Verlauf haben kann, prinzipiell reversibel ist und nicht zu allen Zeitpunkten gleich viel Organe betroffen sein müssen, ist es häufig problematisch, einen definierten Zeitpunkt für die Diagnose festzulegen. Eindeutig zu diagnostizieren sind jene Patienten, bei denen sich ein MODS entwickelt und die im Verlauf versterben. Nur in diesen Fällen liegt ein therapierefraktäres Multiorganversagen (MOV) vor. Für eine Differenzierung der Schwere eines SIRS, MODS, MOV wurden die Patienten nochmals in Überlebende und Verstorbene unterteilt. Das Multiorganversagen wurde in dieser Studie somit als Endstrecke eines MODS betrachtet, das im ungünstigsten Fall zum Tode führte.

Alle Patienten mit einem letalen Verlauf verstarben während des Aufenthaltes auf der Intensivstation. Von überlebenden Patienten wurde gesprochen, wenn diese zur weiteren Behandlung auf eine periphere Station oder in ein anderes Krankenhaus verlegt wurden.

2.3 Labormethodik und Messparameter

2.3.1 Messparameter

Für alle in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden sämtliche Routinelaborparameter täglich im Zentrallabor des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Gießen erfasst. Das mikrobiologische Monitoring umfasste den Nachweis von grampositiven und gramnegativen Bakterien, von Pilzspezies (*Candida*, *Aspergillus*, *Kryptokokkus*) und von atypischen Erregern wie Mykoplasmen, Chlamydien und Rickettsien aus aeroben und anaeroben Abstrichen sowie aus Blutproben. Die Untersuchungen wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Gießen durchgeführt. Die Plasmaspiegel der Zytokine und die Parameter der Fibrinolyse wurden mittels ELISA-Technik in den ersten 48 Stunden 6-stündlich und dann 24-stündlich gemessen (siehe Seite 88). 10 ml Blut wurden in ein mit Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) als Antikoagulanzen gefülltes Röhrchen überführt und sofort nach Abnahme bei 4 °C und 6.000 U/min für mindestens 10 Minuten

zentrifugiert. Anschließend wurde das so gewonnene Plasma in 1,5 ml „Eppendorf“-Hütchen aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Bestimmung der Plasmaspiegel erfolgte bei Raumtemperatur. Es wurden keine Proben verwendet, die bereits aufgetaut waren, um eventuell entstehende Messungenauigkeiten zu vermeiden.

2.3.2 Allgemeines Prinzip des Enzyme-Linked-Immunosorbend-Assay (ELISA)

Beim ELISA erfolgt eine kovalente Bindung des Enzyms an das Antigen oder den Antikörper, diese Verbindung bezeichnet man als Konjugat. Nach der Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen folgt ein Trennschritt. Hierbei werden freie Reaktionspartner vom Immunkomplex getrennt. Anschließend bestimmt man die Aktivität des Markierungsenzyms in der freien oder gebundenen Phase. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe eines Substrates gestartet und das entstehende Reaktionsprodukt photometrisch gemessen. Über Referenzkurven mit Standard-Seren wird die Konzentration der zu messenden Substanz berechnet.

In dieser Studie kamen zwei unterschiedliche Verfahren des ELISA zur Anwendung:

- Der quantitative „Sandwich“-ELISA [41]

In einem ersten Reaktionsschritt bindet sich das Antigen an einen Festphase-Antikörper. Im zweiten Schritt werden die noch freien Antigen-Determinanten mit enzymmarkierten Antikörpern besetzt. Man erhält eine direkte Proportionalität zwischen Antigenkonzentration und Messsignal.

- Der quantitative kompetitive ELISA [41]

Enzymmarkiertes und freies Antigen konkurrieren um einen korrespondierenden Antikörper, der an eine Festphase gebunden ist. Nach Abtrennen der flüssigen Phase wird die Enzymaktivität der festen Phase bestimmt. Man erhält eine inverse Beziehung zwischen Antigenkonzentration und Messsignal (Anhang, Verzeichnis verwendeter ELISA-Tests).

Mit dem ELISA-Analyseverfahren wurden folgende Parameter bestimmt:

- I. Variablen der Fibrinolyse
 - Fibrinogen, Normalwert im Plasma 300 mg/dl
 - Plasminogen, Normalwert im Plasma 10 mg/dl

Gewebe-Plasminogenaktivator-Antigen (t-PA-Ag),

Normalbereich im Plasma <5pg/ml

Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI-1), Normalbereich im Plasma <5 pg/ml

II. Variablen der Immunologie (ELISA)

Tumour necrosis factor alpha (TNF α), Normalbereich im Plasma <10 pg/ml

Tumour necrosis factor alpha Rezeptor I (TNF α rI),

Normalbereich im Plasma <2 ng/ml

Tumour necrosis factor alpha Rezeptor II (TNF α rII),

Normalbereich im Plasma <2 ng/ml

Interleukin 1 beta (IL-1 β), Normalbereich im Plasma <3,9 pg/ml

Interleukin 2 (IL-2), Normalbereich im Plasma <1,1 U/ml

Interleukin 2 Rezeptor (IL-2r), Normalbereich im Plasma <650 U/ml

Interleukin 6 (IL-6), Normalbereich im Plasma <300 ng/ml

Interleukin 8 (IL-8), Normalbereich im Plasma <10 pg/ml

Interleukin 10 (IL-10), Normalbereich im Plasma <50 pg/ml

Transforming growth factor beta (TGF- β), Normalbereich im Plasma <10 ng/ml

Prostaglandin 2 alpha (PGE $_2\alpha$), Normalbereich im Plasma <1,5 pg/ml

2.3.3 Molekularbiologische Untersuchungsmethoden

2.3.3.1 Prinzip der DNA-Isolation aus EDTA-Vollblut

Die Aufbereitung genomischer DNA aus EDTA-Vollblutproben wurde mit der Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt, die im Folgenden beschrieben wird.

10 ml EDTA-Vollblut werden mit 25 ml kühlem Kernextraktionspuffer (siehe Seite 89) gemischt, dreimal für je 5 bis 10 Sekunden gevortext, mit Kernextraktionspuffer bis auf 50 ml aufgefüllt und bei 4 °C 10 Minuten mit 1.500 U/min zentrifugiert. Der wässrige Überstand wird verworfen. Das Pellet wird mit 1 ml DNA-Extraktionspuffer (siehe Seite 89) und 100 µl 20 % Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)-Lösung resuspendiert, mit etwa 10 µg Proteinase K versetzt und über Nacht im Wasserbad bei 50 °C belassen.

In ein 50 ml Falcongefäß werden zu 1 ml der obigen DNA-Lösung 15 ml Phenol hinzugefügt, 20 bis 30 Minuten vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur (RT) mit 3.000 U/min zentrifugiert. Von dieser wässrigen Lösung wird dann 1 ml in ein mit 0,5 ml Phenol gefülltes Eppendorf-Reaktionsgefäß übertragen, für 20 bis 30 Minuten vorsichtig bei RT gemischt und für 10 Minuten bei RT mit 2.500 U/min zentrifugiert. Anschließend werden 0,5 ml der wässrigen DNA-haltigen Phase in ein mit 0,75 ml Phenol-Chloroform-Gemisch gefülltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 20 bis 30 Minuten durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Der Ansatz wird anschließend bei RT für 10 Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert. Mit 0,5 ml des wässrigen DNA-haltigen Überstandes wird der Vorgang der Phenol-Chloroform-Extraktion so oft wiederholt, bis die Interphase zwischen wässriger und organischer Phase klar erscheint. Der DNA-haltige Überstand wird in ein neues, mit 1 ml „Zeitspar-Alkohol“ (Lösung aus absolutem Alkohol und $\frac{1}{20}$ Volumenteil Natrium-Acetat-Lösung (3 mol, pH 5,2)) gefülltes Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Die Lösung wird vorsichtig etwa 5 bis 10 Minuten geschwenkt, bis die DNA ausgefällt ist und keine Schlieren mehr zu erkennen sind. Die Lösung wird dann für 30 Minuten bei –30 °C gekühlt und nochmals bei RT für 15 Minuten mit 13.000 rpm zentrifugiert. Der alkoholische Überstand wird verworfen, das Pellet zweimal mit 70 %igem Alkohol gewaschen. Die gefällte DNA wird nochmals 10 Minuten bei 13.000 U/min und RT zentrifugiert. Schließlich wird das Eppendorf-Reaktionsgefäß samt Inhalt für ca. 5 Minuten auf einer Reinraumbank getrocknet. Das

getrocknete Pellet wird mit 500 µl Tris-Puffer-Lösung, die als RNA-spaltendes Enzym für eventuell eingeschleppte RNA 1 µl RNase A enthält, resuspendiert und für etwa 12 bis 14 Stunden bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Die fertige Lösung wird bis zur weiteren Verwendung portioniert bei 5 bis 8 °C im Kühlschrank gelagert.

2.3.3.2 Allgemeines Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Durch die von Kary B. Mullis et al. und Saiki et al. 1985 entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction [PCR]) ist die Vervielfältigung (Amplifikation) einer definierten DNA-Sequenz in vitro möglich geworden [136,163].

Die hierfür verwendeten Enzyme sind DNA abhängige DNA-Polymerasen. Grundsätzlich wird zur DNA-Synthese von einem einzelsträngigen Ausgangsnukleinsäurestrang (Matrixstrang) ein gegenläufiger, komplementärer Strang angefertigt. Dafür muss eine Startsequenz (Primer, einzelsträngige Oligonukleotide mit ca. 15 bis 30 Nukleotiden) in Form eines zum Matrixstrang komplementären Oligonukleotids mit einem freien 3'-Hydroxylrest vorhanden sein. Diese Primer binden komplementär an die DNA, die als Zielsequenz amplifiziert werden soll. Als Substrat der Reaktion dienen Desoxyribonukleotidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), die in ausreichender Konzentration dem Reaktionsgemisch zugegeben werden müssen.

Zuerst erfolgt die Denaturierung der noch doppelsträngigen in ihrer helikalen Form vorliegenden DNA in ihre Einzelstränge durch Erhitzung des Reaktionsgemischs auf 90 °C für ungefähr 15 bis 30 Sekunden. Anschließend erfolgt die Bindung (Annealing) der Primer an ihre komplementären DNA-Fragmente durch Wasserstoffbrücken. Die Annealingzeit ist abhängig von der Primerlänge, die Annealingtemperatur von der Primerzusammensetzung. Die Temperatur sollte unterhalb der Schmelztemperatur der Primer liegen, aber hoch genug sein, dass die Primer an ihre spezifische Zielsequenz binden, denn mit der Temperatur kann die Spezifität der Reaktion gesteuert werden. Durch die Wahl einer zu niedrigen Temperatur ist eine Hybridisierung an eine nicht perfekt passende, aber genetisch verwandte Matrix-DNA möglich. Die Primerbindungsstellen werden möglichst so ausgewählt, dass sie einen Guanin-Cytosin-Gehalt von etwa 50 % bis 60 % aufweisen. Hierbei binden die Primer in Sekundenbruchteilen an die antiparallelen 5'-Enden des Amplifikates. Dies gewährleistet, dass man die Temperatur für das

Annealing, also die Stringenz für die Hybridisierung der Primer an den Matrixstrang, relativ hoch wählen kann, was wiederum die Spezifität der Amplifikation gewährleistet. Zu beachten ist auch, dass Primer weder zu sich selbst, noch innerhalb eines Primerpaares längere, komplementäre Basenabfolgen tragen. Existieren längere komplementäre Basenabfolgen in einem Primerpaar, so entstehen gehäuft Primer-Dimere und der Amplifikationsfaktor sinkt. Anschließend verlängert eine thermostabile DNA-Polymerase die Primer in 3'-Richtung komplementär zum DNA-Template (Extension). Die so genannte Extensionstemperatur sollte dem Temperaturoptimum der DNA-Polymerase entsprechen. Die Extensionszeit muss der Größe der Ziel-Sequenz angepasst werden (1 min pro Kilobase (kb)). Nach einer Reaktionszeit von 15 bis 60 Sekunden, abhängig von der Länge der zu amplifizierenden Sequenz, ist die DNA-Synthese abgeschlossen und die DNA wird erneut denaturiert. Nach Vervollständigung der Stränge beginnt der Zyklus von neuem. Die neuen Stränge aus dem ersten Zyklus sind an ihrem 5'-Ende durch die Primer eindeutig begrenzt, während das 3'-Ende eine variable Länge aufweist. Ab dem zweiten Zyklus entstehen an diesen DNA-Abschnitten erstmals Amplifikate, die in ihrer Länge durch die beiden Primer definiert sind. Bei jeder Abfolge von Denaturierung, Annealing und Extension wird der durch die Primer definierte Nukleinsäureabschnitt verdoppelt. Da die entstandenen Produkte wiederum Substrate des nächsten Zyklus sind, kommt es zu einer theoretisch exponentiellen Mengenzunahme der Zielsequenz. Dabei nimmt die Menge der beidseitig genau begrenzten Produkte, die ab dem zweiten Zyklus erscheinen, annähernd exponentiell zu, während die einseitig und damit weniger genau begrenzten Produkte nur linear mit der Anzahl der Zyklen anwachsen. Die DNA-Polymerasen, deren Temperaturoptimum in den meisten Fällen zwischen 68 bis 75 °C liegt, entdeckte man in thermophilen Bakterien, die vorzugsweise in heißen Quellen leben. Die DNA-Polymerase, die auch heute noch am häufigsten für die PCR verwendet wird, ist die Taq-Polymerase aus **Thermophilus aquaticus** (Temperaturoptimum: 72 °C) beheimatet im Yellowstone Nationalpark, USA. Diese Taq-Polymerase wurde auch für diese Studie verwendet.

Die einzelnen Komponenten für den Reaktionsansatz werden zusammen mit einem spezifischen Puffer für die Taq-Polymerase in den für die Reaktion optimalen Konzentrationen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt. Die Reaktion startet man in einem „Thermocycler“, der eine zyklische Abfolge der einzelnen Reaktionsschritte erlaubt.

Standard-Reaktionsansatz:

- 10-50 ng Template-DNA
- 10 µl Nukleotidmix (je 1,25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 5 µl 10 x Taq-Puffer
- 1 µl Primer A (50 pmol)
- 1 µl Primer B (50 pmol)
- 2 µl Taq-Polymerase
- ad 50 µl mit A. bidest

Der Reaktionszyklus, der ca. 25- bis 35-mal wiederholt wird, startet im Allgemeinen mit einem Denaturierungsschritt. Diesem PCR-Grundschemata wird häufig noch ein finaler Verlängerungsschritt (5 bis 10 min.) angehängt. Auch kann die Reaktion mit einem einmaligen Denaturierungsschritt gestartet werden (2 bis 3 min.). Eine 10^6 - bis 10^7 -fache Anreicherung stellt im Allgemeinen die durchschnittliche Vermehrungsrate dar, aufgrund der Abnahme der Aktivität der DNA-Polymerase mit exponentiellem Anstieg der DNA-Menge.

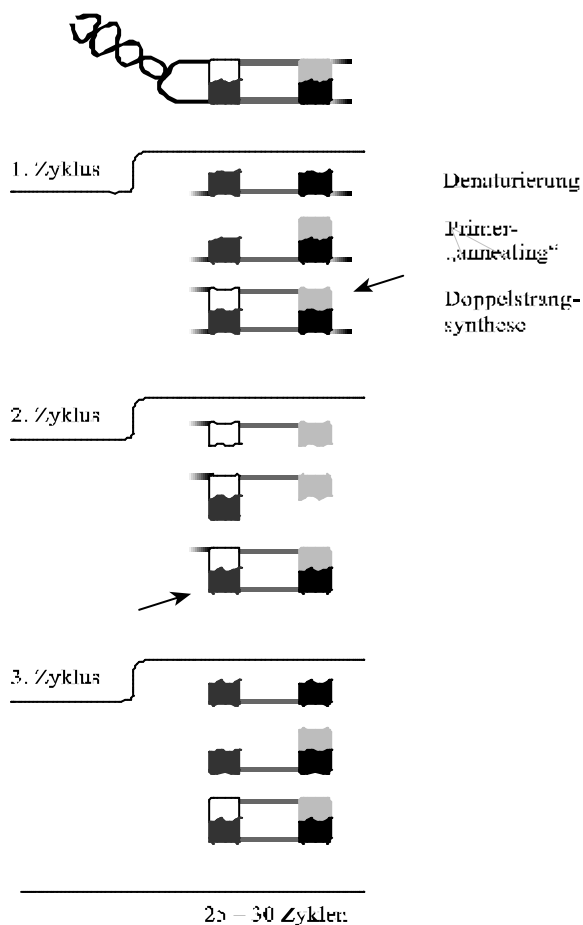


Abbildung 4: Schematische Darstellung der PCR.

2.3.3.3 Theoretische Aspekte der PCR

Die letztlich zum Nachweis zur Verfügung stehende Menge der DNA-Zielsequenz einer PCR $(DNA)_{PCR}$ entspricht der Summe aus der eingesetzten $(DNA)_{Orig}$ und der in jedem Zyklus generierten DNA-Menge.

$$(DNA)_{PCR} = \Sigma (DNA)_{Orig} + (DNA)_1 + (DNA)_2 + \dots + (DNA)_n$$

Gleichung 1: Quantitative Bestimmung des PCR-Produktes.

Da bei jedem Zyklus die Gesamtmenge der Ziel-DNA verdoppelt wird,

$$(DNA)_{i+1} = (DNA)_i \times 2$$

Gleichung 2: Verdopplung des Produktes pro Amplifikationssequenz.

folgt daraus für eine PCR mit n Zyklen ein 2^n facher Mengenanstieg.

$$(DNA)_{PCR} = (DNA)_{Orig} \times 2^n$$

Gleichung 3: Abhängigkeit der Produktmenge von der Anzahl der Zyklen.

Dabei verschieben sich die Anteile von einseitig begrenzten DNA-Amplifikaten $(DNA)_{lang}$ zu beidseitig begrenzten Amplifikaten $(DNA)_{kurz}$. Erstere nehmen nur linear zu, letztere beinahe exponentiell.

$$(DNA)_{PCR} = (DNA)_{Orig} + (DNA)_{lang} \times n + (DNA)_{kurz} (2^n - n - 1)$$

Gleichung 4: Verhältnis der Elternstränge zu den Tochtersträngen im Amplifikat.

Diese Stücke sind für den Nachweis ausschlaggebend.

Bei der Bestimmung der Annealingtemperatur, die experimentell herausgefunden werden muss, ist die Basenzusammensetzung des verwendeten Primers ausschlaggebend.

Es gilt für Primer von etwa 20 Basen Länge:

$$T_{ANN}(^{\circ}C) = 4(G + C) + 2(A + T) - 5$$

Gleichung 5: Rechnerische Ermittlung der Annealingtemperatur.

Der Nachweis der Amplifikate kann einerseits über eine anschließende Hybridisierung der Produkte mit einer spezifischen DNA-Sonde und andererseits direkt im Agarose-Gel

nach Ethidiumbromidanfärbung der DNA-Amplifikate und Vergleich mit DNA-Längenstandards erfolgen.

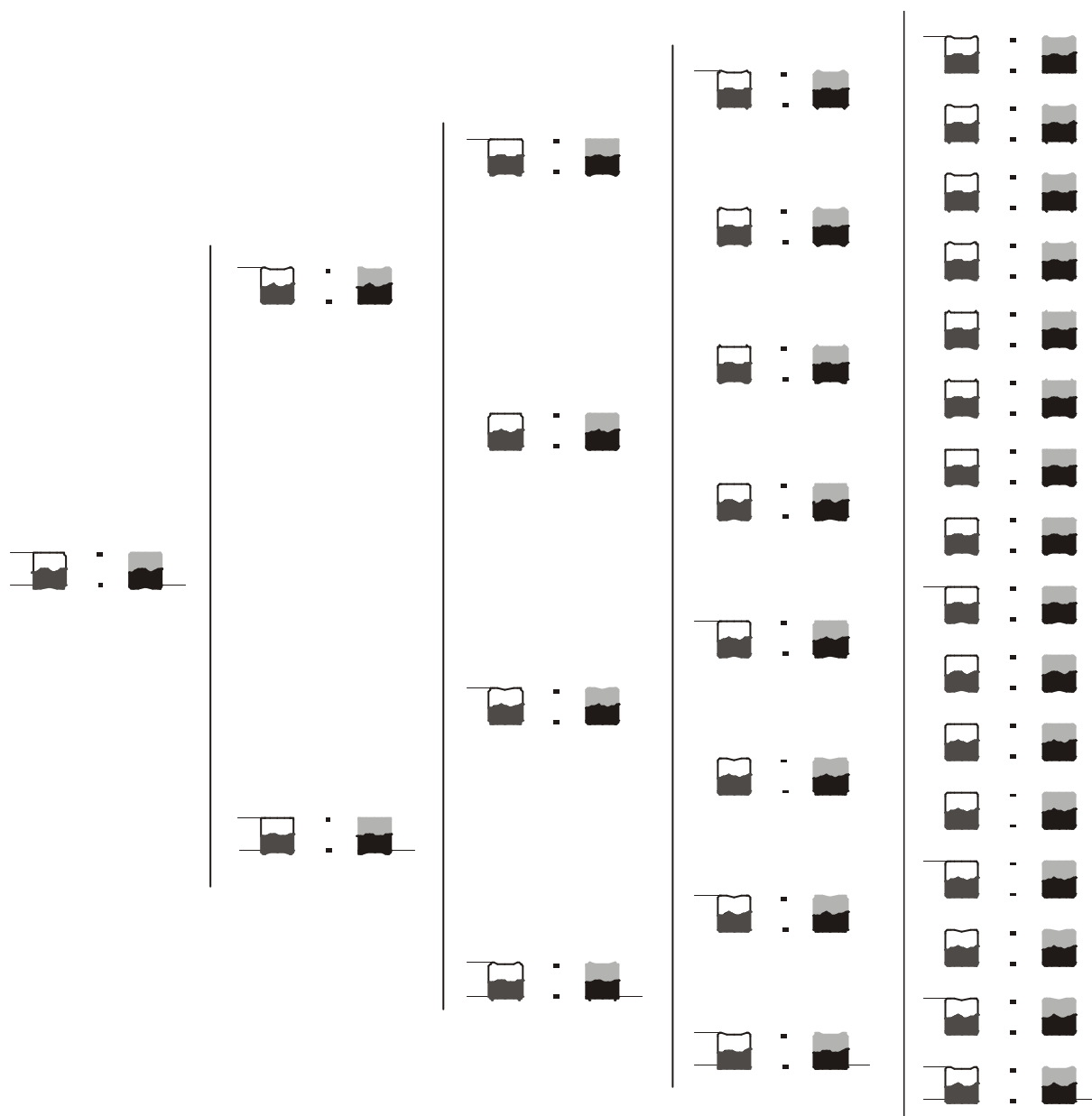


Abbildung 5: Darstellung der Amplifikationsreihe der Elternstränge.

2.3.3.4 Allgemeines Prinzip der elektrophoretischen Auftrennung mit Agarose-Gelen

Die Elektrophorese mit Agarosegelen erlaubt die Auftrennung der DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Die Agarose wird in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, die sich nach der zu erwartenden Größe

des DNA-Fragmentes richtet. Der prozentuale Anteil der Agarose bestimmt die Porengröße der Gelmatrix. Hochprozentige Gele dienen der Auftrennung besonders kleiner Fragmente, während Gele mit niedriger Konzentration den Lauf größerer DNA-Fragmente im elektrischen Feld begünstigen. Die Agarose wird abgewogen und in 1 x Tris-Ammonium-EDTA (TAE) durch kurzes Aufkochen gelöst. Danach wird die flüssige Agarose in eine Flachbett-Gel-Apparatur gegossen. Durch Einstecken eines PVC-Kammes in die Agarose-Lösung erhält man kleine, gleichmäßig angeordnete Gel-taschen (Slots). Die DNA-Proben werden vor dem Auftragen mit Bromphenolblau und Xylencyanol zu 10 x TAE gemischt. Hierdurch kommt es zum endgültigen Stopp der PCR-Reaktion. Nützlicherweise kann man dadurch den Verlauf der Gelelektrophorese überwachen und somit verhindern, dass die aufgetragene Probe aus den Taschen herausdiffundiert.

Um die aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wird das Gel in Ethidiumbromid gebadet und nach ungefähr 10 Minuten mit Wasser gewaschen. Die Ethidiumbromidmoleküle interkalieren in die DNA-Doppelhelix und fluoreszieren bei Bestrahlung mit UV-Licht (254 und 300 nm) im sichtbaren Bereich (500 bis 590 nm). Die Intensität des emittierten Lichtes ist proportional zur Menge der in die DNA eingelagerten Ethidiumbromidmoleküle. Die Konzentration einer DNA-Bande kann durch optischen Vergleich mit DNA-Banden definierter Konzentration des DNA-Längenstandards bestimmt werden. Nach der Beendigung der Elektrophorese wird das Gel zur Dokumentation photographiert.

2.3.3.5 Methode der radioaktiven Markierung von Oligodesoxynukleotiden und DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von Deoxynukleotidtriphosphaten dient in den meisten Fällen der Detektion der Basenabfolge von DNA-Fragmenten meist bekannter Länge. Verschiedene DNA-modifizierende Enzyme (Klenow-Fragment, T4-Polynucleotidkinase) können die Markierungsreaktion mittels unterschiedlicher Mechanismen durchführen. Dabei werden radioaktiv markierte Desoxynukleotide entweder in ein DNA-Fragment eingebaut oder an das 5'-Ende von Oligodesoxynukleotiden angehängt (Cycle Sequencing). Die Reaktion wird in einem Thermocycler durchgeführt. Alle radioaktiven Desoxynukleotide (γ -ATP, α -dCTP) wurden, modifiziert mit dem hochener-

getischen β -Strahler 32 Phosphor, kommerziell erworben. Die radioaktiv markierten Produkte wurden in dieser Arbeit im Rahmen des „Southern-Blots“ für die Erfassung der PAI-1-Genotypen eingesetzt.

Zur 5'-Endmarkierung von Oligodesoxynukleotiden wird die T4-Polynukleotidkinase (PNK) eingesetzt. Dieses Enzym ist in der Lage, den γ -Phosphatrest des radioaktiven γ -ATP auf das 5'-OH-Ende von DNA-Molekülen zu übertragen. Die T4-PNK muss vor der Anwendung in einem „Dilutionspuffer“ 1:10 verdünnt werden.

2.3.3.6 Verfahren der radioaktiven Hybridisierung

Die radioaktive Hybridisierung kann beim „Southern-Blot“ zur Detektion gelelektrophoretisch getrennter DNA-Sequenzen eingesetzt werden [175]. Durch die „Blotting“-Methode werden die gelelektrophoretisch getrennten DNA-Fragmente auf eine Membran übertragen. Diese Membran kann mit einer radioaktiven Sonde hybridisiert werden. Die Sonde bindet an eine komplementäre Sequenz und kann durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Nach Ausmessen kann der Abstand des Signals von den Auftragstaschen des Gels, die auf der Membran markiert werden, mit den Bandenabständen auf dem Photo der Gelelektrophorese verglichen werden.

Die Membran wird mit 10 bis 20 ml Oligo-Hybridisierungslösung luftblasenfrei in eine Plastiktüte eingeschweißt und bei 40 °C vorhybridisiert. Nach zwei Stunden wird die radioaktive Sonde zugegeben. Eine weitere zweistündige Hybridisierungszeit folgt. Die Membran wird etwa 10 min in einer 50 °C warmen Waschlösung (2 x SSC, 0,1 % Natrium Dodecyl Sulfat (SDS)) von der überschüssigen radioaktiven Lösung befreit und auf einem in Klarsichtfolie eingepackten Whatman-Papier exponiert. Nach mehrstündiger Exposition wird der Film entwickelt und das Signal einer Bande auf dem Gelelektrophoresephoto zugeordnet. Das Verfahren wurde zum Nachweis der PAI-1-Genotypen in dieser Studie eingesetzt.

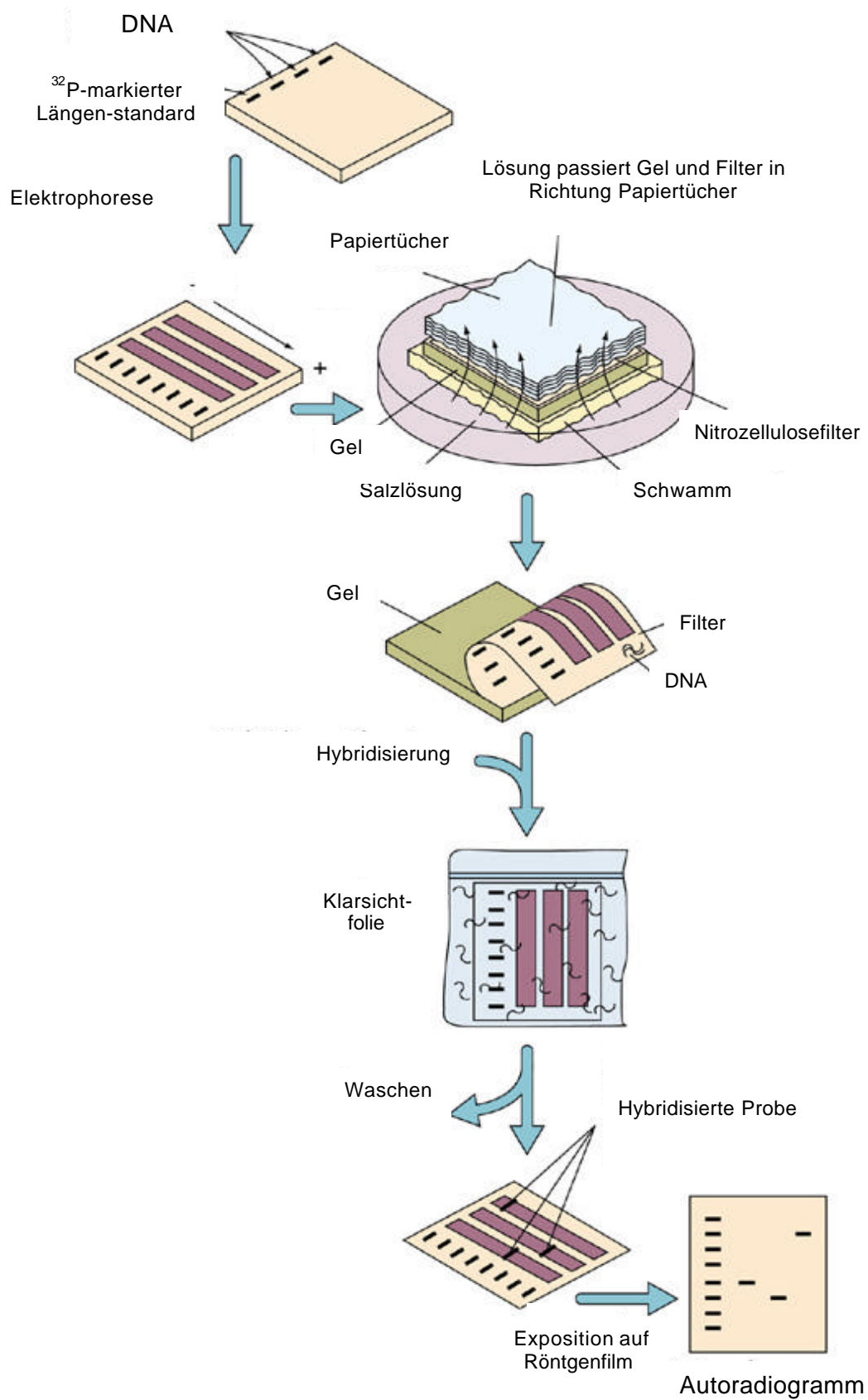


Abbildung 6: Verfahren der radioaktiven Hybridisierung (Southern Blot).

2.3.3.7 Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

Zur Validierung der Ergebnisse der voranbeschriebenen autoradiographischen Detektion wurde ein massenspektrometrisches Verfahren als Gegenprobe verwendet. Bewusst wurde hiermit ein Verfahren ausgewählt, das speziell für den Massendurchsatz an Proben konzipiert ist. Zur massenspektrometrischen Bestimmung erfolgt zunächst die Aufreinigung der PCR-Produkte mit Hilfe des Aufreinigungskits genopure dsTM (siehe Seite 90). Hierbei wird die amplifizierte DNA an magnetische Partikel, „magnetic beads“, gebunden und mit zwei Pufferlösungen, die Isopropanol und Ethanol enthalten, gewaschen. Nach erfolgter Trocknung der Produkte wird die nach wie vor doppelsträngige DNA in Gegenwart der beads eluiert und eine Cycle-Sequencing-Reaktion (siehe Seite 90) 30 Zyklen lang mit markierten Desoxynucleotidtriphosphaten (dNTP) und spezifischen endmarkierten Oligonukleotiden durchgeführt. Nach dieser allelspezifischen Primerextension erfolgt die Produktaufreinigung mit genopure oligoTM (siehe Seite 90), einem Kit zur Aufreinigung einzelsträngiger DNA mit magnetic beads. Hierbei wird die einzelsträngige DNA mit zwei verschiedenen Waschlösungen gereinigt und anschließend von den Magnetpartikeln gelöst. Das Eluat der Primerextension wird getrocknet und 1 µl mit einer Matrix (3-HPA 6g/l, Di-Ammonium-Citrat 1,6g/l) auf einen Anchor-Chip (siehe Seite 90) aufgebracht. Der Anchor-Chip wird in ein BIFLEX III MALDI-TOF (siehe Seite 90), bestückt mit einer Scout MTP Ionenquelle (siehe Seite 90), eingesetzt. Die Probe auf dem Chip wird mit einem gepulsten Laser aus dem Anchor-Chip herausgelöst und die Flugzeit des ionisierten Oligonucleotids durch eine evakuierte Röhre bestimmt. Für jede Probe werden die Spektren von 15 Messungen gesammelt und ihr Mittelwert bestimmt. Aufgrund der gemessenen Flugzeit des Oligonucleotids wird mittels des Softwarepakets genotoolsTM SNP-Manager (siehe Seite 90) die Masse des Produktes berechnet und der gesuchte Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) angegeben. Durch die Automatisierung der Probenaufbereitung und des Messverfahrens können mehrere tausend Proben pro Tag mit einer wesentlich höheren Messgenauigkeit bearbeitet werden, als dies herkömmliche molekularbiologische Verfahren im Labormaßstab leisten können. Die MALDI-TOF MS-Analyse wurde in dieser Studie durchgeführt zur Validierung der Ergebnisse der im vorhergehenden Kapitel beschriebenen autoradiographischen Detektion.

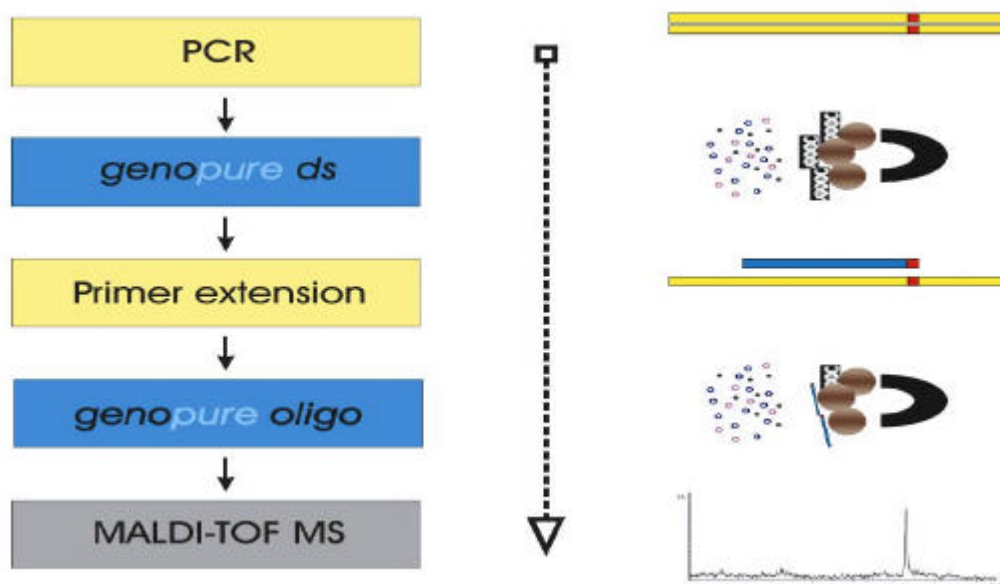


Abbildung 7: Prozessierung der Proben für MALDI-TOF MS.

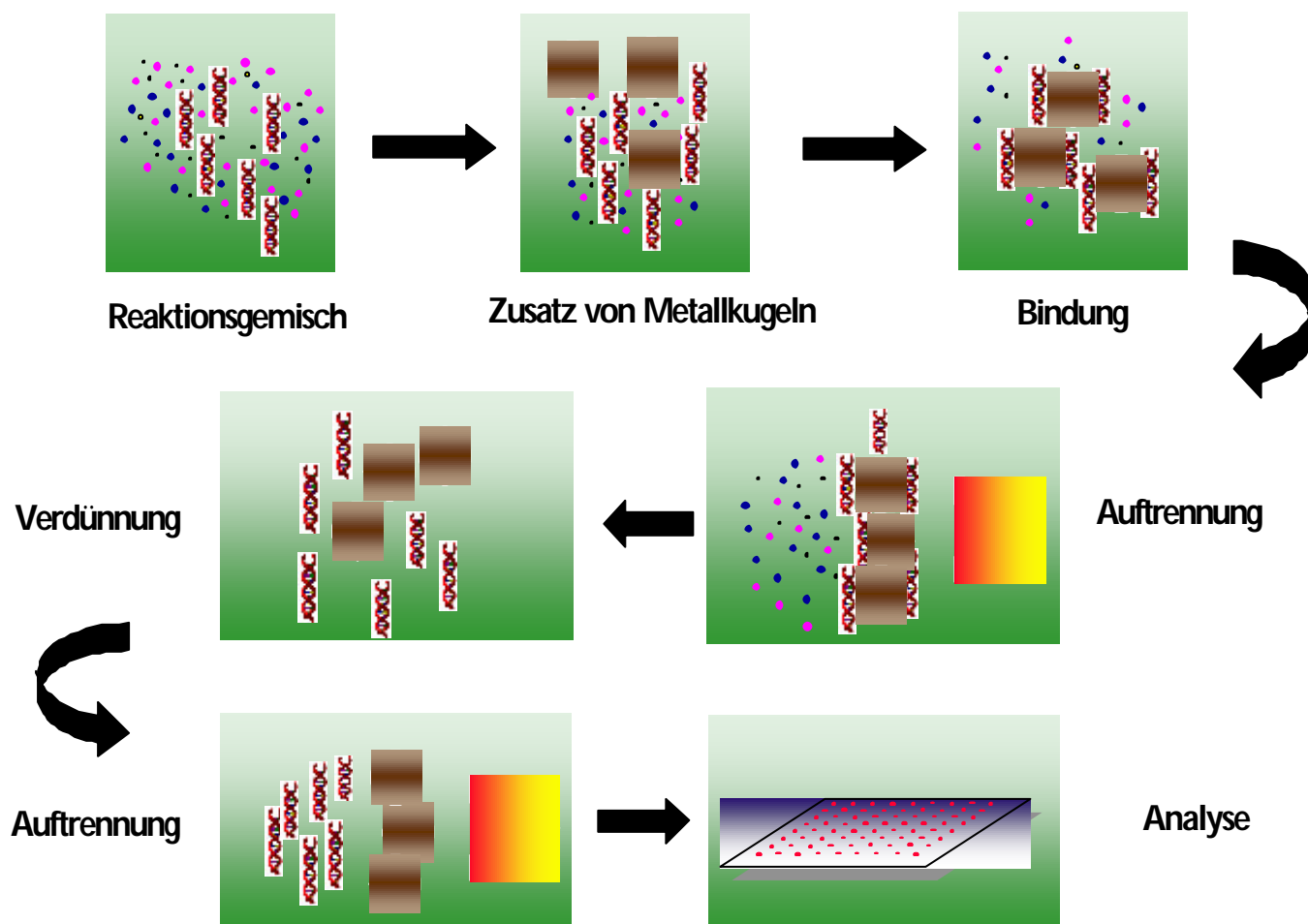


Abbildung 8: Bearbeitung der Proben mit magnetic beads.

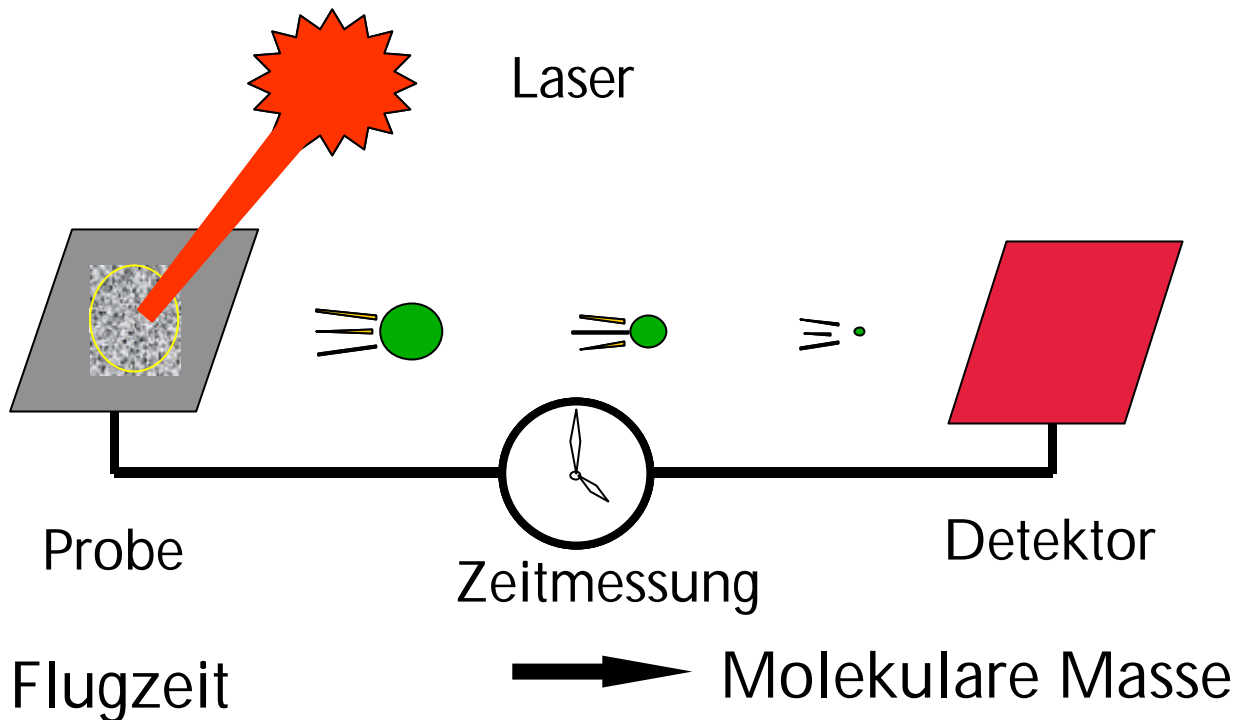


Abbildung 9: Prinzip des MALDI-TOF MS-Messverfahrens.

2.3.3.8 Bestimmung der PAI-1-Genotypen mit Autoradiographie

Zur Genotypisierung wurde ein 890 Basenpaare umfassendes Fragment der Promoterregion des PAI-1-Gens amplifiziert. Zur Amplifizierung wurden die von Dawson et al. beschriebenen beiden Primer 5'-AAGCTTTTACCATGGTAACCCCTGGT-3' (PAI-1-L) und 5'-GGAGCTGCAGGAATTCAGC-TGCTGGA-3' (PAI-1-R) benutzt [44]. In 100 µl Reaktionsgemisch waren 1 µg genomischer DNA gelöst. Der Amplifikationsmodus der PCR umfasste 35 Zyklen zu jeweils 94 °C (60 s), 55 °C (30 s) und 72 °C (60 s). Das PCR-Produkt wurde mit einem einprozentigen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, denaturiert und auf zwei Filterblättern aus Nitrocellulose (siehe Seite 89) übertragen (doppelt geblottet). Zwei allelspezifische, 14 Oligonukleotide umfassende Primer, 5'-CACGTGGGGAGTCA-3' (PAI-1/4G) und 5'-ACGTGGGGGAGTCA-3' (PAI-1/5G) wurden zur Hybridisierung genutzt. Die beiden endständig mit γ^{32} Phosphor-ATP markierten Oligonukleotide hybridisierten separat bei 41 °C über eine Stunde in einem speziellen Reaktionsmedium (5 x Denhardt's Lösung, 5 x SSPE (3 M NaCl, 0.2 M NaH₂PO₄, 20 mM EDTA, 0,1 % Natrium Dodecyl Sulfat und 0,1 g/l denaturierte Lachssperma-DNA). Überschüssige Reagenzien wurden bei 47 °C mit einer Mischung aus 3 x SSPE und 0,1

% SDS ausgewaschen. Die Nitrocellulosefilter wurden dann einzeln für 4 bis 5 Stunden auf eine Entwicklerfolie gelegt und entwickelt. Die Zuordnung der Genotypen erfolgte anschließend im Vergleich zu Standards.













	Referenz	Patient
4G homozygot		
4G Primer		
5G Primer		
5G homozygot		
4G Primer		
5G Primer		
heterozygot		
4G Primer		
5G Primer		

Abbildung 10: PAI-1-Autoradiographie.

2.3.3.9 Bestimmung der PAI-1-Genotypen mit MALDI-TOF MS

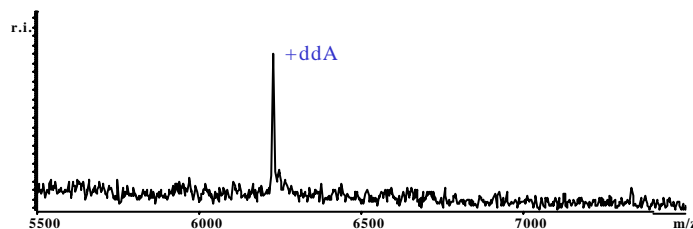
Die massenspektrometrische Genotypisierung bevorzugt kleinere Fragmente. Deshalb wurden im Genom innerhalb des 890bp großen, im Kapitel 2.3.3.8 beschriebenen Fragments, neue Primer gelegt. Das neue PCR-Produkt umfasst 129bp. Alle folgenden PCR- und Primerextensionsreaktionen wurden mit einem MJ PTC 225 Tetrad thermocycler (siehe Seite 89) durchgeführt. Zur Amplifizierung wurden die nachfolgend genannten Primer verwendet:

PAI-1u 5'-ACACCTCCAACCTCAGCCCAG-3',

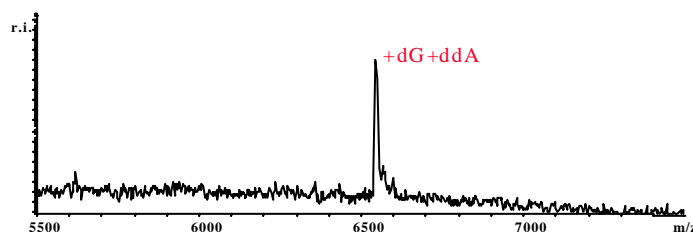
PAI-1d 5'-CTCACGTTGCCTGCTTTTCC-3'.

In 10 µl Reaktionsgemisch waren 10 ng genomische DNA, 200 µM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 5 pmol der beiden oben beschriebenen Primer PAI-1u und PAI-1d, und 0,5U Taq-Polymerase (siehe Seite 89) gelöst. Die PCR umfasste nach „simplified hot start“

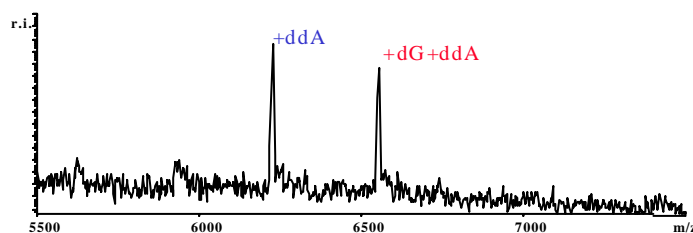
(hier wird das Reaktionsgemisch erst nach Erreichen der Zieltemperatur des Thermocyclers in den Heizblock eingesetzt) einen Denaturierungsschritt von zwei Minuten bei 94 °C und 35 Zyklen zu jeweils 94 °C (10 s), 62 °C (25 s) und 72 °C (15 s). Nach einer „final extension“ bei 72 °C für zwei Minuten wurde das PCR-Produkt bei 8 °C bis zur weiteren Bearbeitung gekühlt. Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte mit genopure dsTM (siehe Seite 90). Für die Primerextensionsreaktion wurde dem Reaktionsgemisch 0,5U Thermosequenase (siehe Seite 90), 2mM MgCl₂ und 5pmol des spezifischen Extensionsprimers (siehe Seite 90): PAI-1I 5`-GAGTCTGGACAGGTGGG*G-3` hinzugegeben. Die letzten drei Nukleotide der 3`-Seite sind über eine Phosphorthiosäurebrücke miteinander verbunden. Das „Cycle Sequencing“ umfasste 40 Zyklen bei 94 °C (10s), bei 57 °C (60s) und bei 72 °C (60s). Die Aufreinigung der einzelsträngigen DNA erfolgte mit genopure oligoTM (siehe Seite 90). Das so gereinigte Produkt wurde anschließend mit MALDI-TOF MS bei einer Spannung von 19kV mit einem gepulsten Laser im Linearmodus gemessen und mit Hilfe des Softwarepakets genotoolsTM SNP-Manager (siehe Seite 90) bearbeitet. Die Zuordnung der Genotypen erfolgte anschließend aufgrund der gemessenen Spektren.



4G/4G homozygot



5G/5G homozygot



4G/5G heterozygot

Abbildung 11: Beispiel einer PAI-1 MALDI-TOF MS Analyse.

2.4 Statistische Analyseverfahren

2.4.1 Deskriptive Statistik und Häufigkeitsverteilung

Die statistische Bewertung berücksichtigte 65 Patienten, von denen 8 immunologische Variablen, der APACHE III-Score und der MODS-Score über einen Zeitraum von maximal 28 Tagen erfasst wurden. Einmalig wurden die Parameter ISS, PTS sowie die demographischen Merkmale wie Alter, Körpergewicht und Geschlecht bestimmt.

Für weitere Bewertungsverfahren wurden die Variablen entsprechend dem von Lilliefors modifizierten Kolmogorov-Smirnov-Test mit einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ auf Normalverteilung untersucht. Die nicht normalverteilten Variablen wurden einer logarithmischen Transformation unterzogen. Zur Analyse nicht metrisch skalierten Variablen wurde der Chi-Quadrat (χ^2)-Test nach Pearson (exakt nach Fischer) eingesetzt [110]. Als Hypothese wertet der Chi-Quadrat (χ^2)-Test die Annahme einer mengenmäßig gleichen Verteilung der Variablen in Relation zum davon unabhängigen Faktor (Genotyp des Patienten). Im Falle einer Bestätigung (gleiche Verteilung, keine signifikante Differenz) der Hypothese wurde die Genotypfrequenz mit dem „Linear by Linear Association Test“ bewertet. Dieses differenziertere Verfahren testet in ordinalen Skalen die prozentuale Aufteilung des unabhängigen einzelnen Faktors (Genotyps) in Relation zur jeweils betrachteten Variablen (Prognose, SIRS, MODS). Dabei wird weniger die Unabhängigkeit als die prozentuale Verteilung, d. h. an- oder absteigende Prozentzahlen in einer einzelnen Spalte des Einzelfaktors, gegenüber den betrachteten Variablen gewichtet. Dieser Test ermöglicht damit eine präzisere Aussage zur Assoziation des einzelnen Genotyps [91].

Die statistische Bewertung der prospektiven Studie diente der Klärung folgender Fragen:

- I. Zeigen sich Unterschiede in den morphometrischen Daten, der Häufigkeit des Auftretens eines SIRS, eines MODS bis hin zum Multiorganversagen und der Prognose der Patienten (Outcome), wenn man die Patienten für das Gen PAI-1 entsprechend der drei Genotypen PAI-1 (PAI-1/4G/PAI-1/4G, homozygot; PAI-

1/4G/PAI-1/5G, heterozygot; PAI-1/5G/PAI-1/5G homozygot) in drei Gruppen unterteilt?

- II. Unterscheiden sich die Daten der immunologischen Parameter im zeitlichen Durchschnitt zwischen den analog der Genotypisierung erstellten drei Patientengruppen?
- III. Unterscheiden sich die beobachteten klinischen Daten zwischen den betrachteten Gruppen im zeitlichen Verlauf?

Der Einfluss der Gruppenzugehörigkeit auf den zeitlichen Durchschnitt der untersuchten Parameter wurde mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse überprüft. Waren in der ersten Fragestellung keine signifikanten Unterschiede zu finden, wurde auf eine Einzelbetrachtung zu den jeweiligen Messzeitpunkten verzichtet. Zur Bewertung der Entwicklung der zu analysierenden Parameter im zeitlichen Verlauf wurde ein univariates Messwiederholungsdesign verwendet.

2.4.2 Methodik der logistischen Regression

Für die Schätzung von Risikowahrscheinlichkeiten für ein interessierendes Ereignis (z. B. „Patient verstirbt“) auf der Grundlage des Vorliegens von ordinalskalierten Variablen wird in dieser Arbeit das Modell der logistischen Regression benutzt [91]. Wie in der multivariaten Regression wird hierbei ein Z-Wert errechnet, der aus einer Linearkombination der unabhängigen Variablen X_1 bis X_n entsteht:

$$Z = B_0 + B_1 X_1 + \dots + B_n X_n .$$

Dieser Z-Wert wird jedoch für

das Schätzen der Wahrscheinlichkeit in die Gleichung $p(\text{Ereignis}) = \frac{e^Z}{1 + e^Z}$ eingesetzt.

Übersichtlicher ist dabei das Beobachten der Veränderung des Risikos (Odds) mit der Formel:

$\text{Odds} = \frac{\text{Wahrscheinlichkeit („Ereignis findet statt“)}}{\text{Wahrscheinlichkeit („Ereignis findet nicht statt“)}}$

oder in obigem Kontext:
$$Odds = e^Z = e^{B_0 + B_1 X_1 + \dots + B_n X_n} = e^{B_0} e^{B_1 X_1} \dots e^{B_n X_n}$$

Das Risiko eines Patienten mit dem Vorliegen der Werte X_1 bis X_n ist damit das Produkt der „Einzelrisiken“ der Werte.

Aus dem Odds-Wert kann umgekehrt die Wahrscheinlichkeit p für das interessierende Ereignis errechnet werden:

Wahrscheinlichkeit („Patient verstirbt“) = Odds / (1+ Odds)

Anhand des Zusammenhangs zwischen der Prognose (Outcome) und den einzelnen Genotypen wird folgende Codierung vorgeschlagen:

Parameter	Code		
	1	2	3
PAI-1 4G/5G	55	45	44

Tabelle 6: Codierung der Genotypen.

Dabei wird aufsteigend nach Vorkommen des Outcomes „verstorben“ codiert und nach dem Vorkommen des Ereignisses „Patient verstirbt“ die Wahrscheinlichkeit für dieses Ereignis bei Vorliegen eines Genotypen geschätzt. Entscheidend sind dabei das Schätzen und die Veränderung des Risikos (Odds). Aus dem Odds-Wert kann umgekehrt, wie oben angeführt, die Wahrscheinlichkeit p für das Ereignis „Patient verstirbt“ errechnet werden. Dabei wird aufgrund des geringsten Risikos, posttraumatisch zu versterben, ein „Basiswert“ für das Vorliegen des Genotyps PAI-1/5G/PAI-1/5G homozygot = 55, dem das geringste Letalitätsrisiko unterstellt wird, errechnet. Die Erhöhung des Risikos wird dann bei Veränderungen des Genotyps geschätzt. Dazu wird ein Faktor (Multiplikator) angegeben, mit dem der Basiswert (Rechenwert, dem das geringste Letalitätsrisiko entspricht) multipliziert werden muss, um das neue Risiko zu errechnen.

Im Modell zu schätzen sind also, analog der multivariaten Regression, die Koeffizienten B_0 und B_1 bis B_n . Wie im multivariaten Modell auch können für kategorial unabhängige Parameter Dummy-Variablen eingeführt werden [91].

3 Ergebnisse

3.1 Grunddaten

Die 65 Patienten der Studie wurden hinsichtlich ihres Genotyps folgenden Gruppen zugeordnet:

Gruppe 1	n = 13	PAI-1 5G/5G
Gruppe 2	n = 32	PAI-1 4G/5G
Gruppe 3	n = 20	PAI-1 4G/4G

Es ließen sich für die morphometrischen Daten, die Scores und weitere präklinische Daten keine Unterschiede feststellen. Die Menge homologer Blutkomponenten und die Gesamtmenge kristalloider und kolloidaler Infusionen waren in den ersten 24 Stunden jeweils nicht signifikant unterschiedlich. Die Ordnung der Patienten in Abhängigkeit vom untersuchten Genotyp ergab sowohl für ISS und PTS zum Aufnahmezeitpunkt als auch für den APACHE III- und MOD-Score zu Sepsisbeginn keine signifikanten Unterschiede. Der einzelne Patient hatte im Mittel 6,1 Einzelverletzungen, wobei 83,2 % der Verletzten in Verkehrsunfälle verwickelt waren.

	Gruppe 1 n = 13 PAI-1 5G/5G	Gruppe 2 n = 32 PAI-1 4G/5G	Gruppe 3 n = 20 PAI-1 4G/4G
Alter [Jahre]	39,85 ± 12,85	38,28 ± 12,31	37,32 ± 13,2
Gewicht [kg]	78,62 ± 13,07	77,55 ± 12,35	77,84 ± 8,17
Größe [cm]	168,9 ± 4,4	171,7 ± 3,9	173,1 ± 5,3
Rettungszeit [Minuten]	49 ± 12,8	53 ± 13,3	50 ± 11,7
Therapiefreies Intervall [Stunden]	2,9 ± 1,1	3,2 ± 1,4	3,1 ± 0,9
Präklinische Volumentherapie [ml]	1430 ± 300	1240 ± 390	1430 ± 480
Scores zum Aufnahmezeitpunkt			
ISS [Injury severity score]	30,46 ± 12,03	33,55 ± 15,41	33 ± 15,13
PTS [Polytraumaschlüssel]	33,62 ± 13,57	37,03 ± 17,86	40,68 ± 15,68
Scores zu Sepsisbeginn			
APACHE III	70,5 ± 12,6	59,4 ± 10,8	65,7 ± 11,5
MOD	5,5 ± 2,4	5,8 ± 2,5	5,9 ± 2,1
Blutersatz erste 24 h [EK]	4,1 ± 2,8	4,3 ± 2,9	5,2 ± 2,3
Kristalloide erste 24 h [l]	4,5 ± 2	4,8 ± 1,8	5,1 ± 1,4
Beatmungsdauer [Tage]	11,3 ± 2,7	13,7 ± 1,9	12,9 ± 2,9
Infektionsfokus [Häufigkeit, %]			
Lunge	1 [7,7]	5 [15,6]	9 [45,0]
Abdomen / Becken	-	2 [6,2]	2 [10,0]
Haut / Wunden	-	2 [6,9]	4 [20,0]
Katheter	-	1 [3,5]	1 [10,0]
Sonstiges	-	-	1 [10,0]

Tabelle 7: Morphometrische Daten der Patientengruppen.

3.1.1 Unfallmechanismus

Der Unfallmechanismus spielt zwar in den Definitionen des Polytraumas und der Entwicklung eines posttraumatischen SIRS und MODS keine Rolle, soll hier aber dennoch berücksichtigt werden. Es wurden die Verletzungsursachen analysiert. Die Verteilung innerhalb jeder Gruppe ist prozentual dargestellt. In allen Gruppen waren Autounfälle am häufigsten, vor Unfällen als Motorrad- bzw. Fahrradfahrer oder Fußgänger. Eine weitere große Gruppe von Patienten verunfallte durch einen Sturz aus großer Höhe.

	Gruppe 1 n = 13 PAI-1 5G/5G	Gruppe 2 n = 32 PAI-1 4G/5G	Gruppe 3 n = 20 PAI-1 4G/4G
penetrierende Wunden	0	3	1
Motorradunfall	3	8	6
Autounfall	6	15	10
Fußgänger/Fahrradunfall	1	3	1
Sturz aus größerer Höhe	3	1	1
Sonstige	0	2	1

Tabelle 8: Verteilung der Unfallmechanismen.

3.1.2 Verletzungsmuster

Bei der Untersuchung des Verletzungsmusters wurden sämtliche Einzeldiagnosen zum Zeitpunkt der Aufnahme des Patienten auf die Operative Intensivstation einer der folgenden sechs Kategorien zugeordnet:

- Schädelverletzungen,
- Thoraxverletzungen,
- Abdominalverletzungen,
- Becken-/Wirbelsäulenverletzungen,
- Extremitätenverletzungen und
- Weichteilverletzungen.

Zu den Schädelverletzungen zählten Mittelgesichtsverletzungen und Gesichtsfrakturen. Den Thoraxverletzungen wurde neben Rippenserienfrakturen, Pneumo- und Hämato-pneumothorax auch eine röntgenologisch und bronchoskopisch gesicherte Lungenkontusion zugeordnet. Unter den Abdominalverletzungen waren Milz- und Leberrupturen, Nieren- und Pankreasverletzungen und penetrierende Intestinalverletzungen. Beckenverletzungen bestanden aus Beckenschaufel- und Beckenringfrakturen mit und ohne Beteiligung der Organe des kleinen Beckens. Mit Ausnahme von Wirbelsäulen- und Beckenfrakturen wurden sämtliche, den Bewegungsapparat betreffenden Läsionen zu den Extremitätenverletzungen gezählt, hierunter fielen ausgeprägte Decollements, zweit- und drittgradig offene Frakturen und Subamputationen. Mehrfache Verletzungen

in einer Untergruppe, z. B. mehrfache Knochenfrakturen, wurden lediglich einmal berücksichtigt. Die Prozentzahl bezieht sich auf die Gesamtzahl der Patienten der jeweiligen Gruppe.

	Gruppe 1 n = 13 PAI-1 5G/5G	Gruppe 2 n = 32 PAI-1 4G/5G	Gruppe 3 n = 20 PAI-1 4G/4G
Schädel	11	15	21
Thorax	37	59	81
Abdomen	35	47	55
Becken/Wirbelsäule	68	61	79
Extremitäten	73	72	88
Weichteile	32	30	41

Tabelle 9: Prozentuale Verteilung der Verletzungen (Verletzungsmuster) innerhalb der einzelnen Patientengruppen.

3.1.3 Operative Versorgung

Die weitere operative Versorgung eines polytraumatisierten Patienten während der vulnerablen Phase nach einem Trauma (innerhalb der ersten fünf Tage nach einem Trauma) kann als „second hit“ betrachtet werden. Deshalb interessierten bei der Beurteilung der operativen Versorgung vor allem zwei Gesichtspunkte: der Zeitpunkt und die Art der Operation.

Die durchgeführten Operationen wurden vier Gruppen zugeordnet. Da sich viele Patienten mehr als einer Operation im Untersuchungszeitraum unterziehen mussten, wurde jede einzelne Operation gezählt. Das Ergebnis (in Prozent) bezieht sich daher auf die Gesamtzahl der Operationen, nicht auf die Zahl der Patienten innerhalb der Gruppen. Zur Osteosynthese wurden Operationen jeglicher Art gezählt, die zur Stabilisierung einer Fraktur beitrugen (Fixateur extern, -intern, Marknagel, Platte, Drahtung etc.). Abdominelle Operationen umfassten die Übernähung von Milz- und Leberrupturen (inklusive Milzexstirpationen), in sieben Fällen eine Nekrosektomie nach traumatischer Pankreasruptur mit anschließender Etappenlavage (die Lavagen gingen in die Wertung ein) sowie drei Nephrektomien. In fünf Fällen musste nach penetrierenden Verletzungen des

Darms ein Darmsegment reseziert werden. Eine Thoraxoperation mit Eröffnung des Brustraumes war in vier Fällen notwendig. Unter Wundrevisionen wurden ausgedehnte Nekrosenabtragungen bei Weichteilverletzungen, Hautdeckungen, Wundöffnungen und Debridements zusammengefasst.

	Gruppe 1 n = 13 PAI-1 5G/5G	Gruppe 2 n = 32 PAI-1 4G/5G	Gruppe 3 n = 20 PAI-1 4G/4G
Thoraxoperation	0	11	7
Abdominaloperation	31	21	25
Osteosynthesen	58	57	61
Wundrevisionen	11	10	7
keine Operationen	0	1	0

Tabelle 10: Prozentuale Verteilung der Operationen innerhalb des Messzeitraumes, gemessen an der Gesamtzahl der Operationen innerhalb der einzelnen Gruppen.

Bei einer Gesamtzahl von 370 Operationen wurden pro Patient durchschnittlich $5,7 \pm 1,4$ Operationen durchgeführt. Am Tag des Traumas wurden 49,4 % aller Operationen durchgeführt. Der Rest verteilte sich auf die folgenden Tage: 2. Tag 15,7 %, 3. Tag 5,3 %, 4. Tag 11,8 %, 5. Tag 2,7 %, 6. Tag 6,5 %, 7. Tag 8,6 %. Es wurden somit bei etwa 35% der Patienten in der vulnerablen Phase zwischen dem zweiten und fünften Tag nach dem Unfall Operationen durchgeführt. Eine Häufung bei den verstorbenen Patienten war aber nicht festzustellen.

3.2 Allgemeine klinische Daten

An 529 Untersuchungstagen wurden 1307 mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt, pro Patient durchschnittlich 20,1 Abstriche. Mehr als die Hälfte war positiv (825 = 63,1 %). Bakterielle Infektionen gingen am häufigsten von den Atemwegen aus. Es gab keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Häufigkeit, der Lokalisation einer Infektion und der Art der Keimbesiedlung der Patienten. Grampositive Erreger waren bei sechs Patienten (9,3 %) Ursache der Sepsis, wohingegen eine gemischte oder rein gramnegative Sepsis für 19 Patienten (29,2 %) nachweisbar war. Eine systemische Can-

didactylis-Infektion lag bei zwei Patienten (3,1 %) der Sepsis zugrunde. Bei einem Patienten (1,5 %) konnte eine atypische Pneumonie mit Mykoplasmen nachgewiesen werden.

Infektionserreger	Gruppe 1 n = 13 PAI-1 5G/5G	Gruppe 2 n = 32 PAI-1 4G/5G	Gruppe 3 n = 20 PAI-1 4G/4G
Grampositiv			
Staphylokokkus aureus	-	-	1
Pneumokokken	-	1	1
Koagulase negative Staphylokokken [CNS]	-	-	-
Enterokokken	-	1	2
Gramnegativ			
Escherichia coli	-	1	2
Pseudomonas aeruginosae	1	3	3
Klebsiellen	-	1	2
Serratia ssp.	-	1	1
Enterobacter	-	1	1
Bacteroides	-	-	1
Candida ssp	-	1	1
Mycoplasmen	-	-	1
Sonstiges	-	-	1

Tabelle 11: Keimspektrum der Patienten bei PAI-1-Genotypisierung.

Eine wesentliche Differenz zwischen den analog der PAI-1-Genotypisierung erstellten Patientengruppierungen konnte für die mittlere Keimzahl pro Patient, das Keimspektrum und die Resistenzlage nicht aufgezeigt werden. Die begleitende antibiotische Abdeckung während der Intensivtherapie war für alle Patienten vergleichbar und lag bei über 80 % der Behandlungstage.

Die Betrachtung der 28 septischen Patienten hinsichtlich der drei Genotypgruppen des untersuchten PAI-1-Genpolymorphismus zeigte signifikante Unterschiede. Insgesamt 17 septische Patienten wurden PAI-1/4G//PAI-1/4G homozygot typisiert. Zehn septische Patienten konnten dem Genotyp PAI-1/4G//PAI-1/5G heterozygot zugeordnet werden und für einen Patienten war der Genotyp PAI-1/5G//PAI-1/5G homozygot erfassbar.

Sepsis	PAI-1 4G/4G	PAI-1 4G/5G	PAI-1 5G/5G	Summe
Septisch	17[85%]	10[31,3%]	1[7,7%]	28[43,1%]
keine Sepsis	3[15%]	22[68,8%]	12[92,3%]	37[56,9%]
Summe	20	32	13	65

Chi-Quadratkoeffizient: $\chi^2 = 16,708$ mit $p = 0,0001$

Tabelle 12: Sepsis (Prozentwerte sind Prozentwerte der Spalten).

Organfunktionsstörungen waren zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses wie auch im weiteren Verlauf der Studie in Anzahl und Verteilung für alle 65 polytraumatisierten Patienten ohne signifikanten Unterschied.

	Gruppe 1 n = 13 PAI-1 5G/5G	Gruppe 2 n = 32 PAI-1 4G/5G	Gruppe 3 n = 20 PAI-1 4G/4G
Herz-Kreislauf (Schock)	68%	75%	78%
Lunge	55%	59%	49%
Niere	41%	30%	40%
Leber	17%	44%	26%
Gastrointestinaltrakt	22%	25%	31%
Gerinnung	11%	23%	9%

Tabelle 13: Häufigkeit von Organdysfunktionen der Patienten.

3.3 Genotypisierung der polytraumatisierten Patienten

Die Verteilung der einzelnen Genotypen der Patienten für PAI-1 (PAI-1/4G//PAI-1/4G, 31,1 %; PAI-1/4G//PAI-1/5G, 47,5 %; PAI-1/5G//PAI-1/5G 21,3 %) entsprach der des Normalkollektivs von 32 Patienten. Auch der Vergleich der Allelfrequenzen der Patienten mit der Verteilung des PAI-1 (PAI-1/5G 45 %, PAI-1/4G 55 %) entsprach der Allelfrequenz des Normalkollektivs. Von den insgesamt 65 polytraumatisierten Patienten der Studie entwickelten 28 (43,1 %) eine Sepsis, 23 (35,4 %) schwerwiegende Organfunktionsstörungen bis hin zum Multiorganversagen und 21 (32,3 %) verstarben zwischen dem 13. und 35. Tag nach Studieneinschluss. Nicht überlebende Patienten zeigten, im Gegensatz zur Allelfrequenz aller polytraumatisierten Patienten, für das Allel

PAI-1/4G eine signifikant höhere Prävalenz (PAI-1 (63,2 %)). Allgemein war für den Zwei-Allel-Polymorphismus im PAI-1-Genlocus eine auffällige Genotypverteilung in Assoziation zur Entwicklung einer Sepsis, dem Auftreten eines Multiorganversagens und der Prognose des Patienten festzustellen.

Gruppiert man die Patienten analog den PAI-1-Genotypen PAI-1/4G//PAI-1/4G, PAI-1/4G//PAI-1/5G und PAI-1/5G//PAI-1/5G, so lässt sich folgende Verteilung der Patienten erfassen: Ein Multiorganversagen entwickelten 16 der 20 PAI-1/4G homozygoten Patienten. 84,2% der PAI-1/4G homozygoten Patienten entwickelten eine Sepsis (siehe Tabelle 9). 12 von 20 PAI-1/4G homozygoten Patienten verstarben. 71 % der 32 PAI-1/4G//PAI-1/5G heterozygoten Patienten und 84,6 % der 13 PAI-1/5G homozygoten Patienten überlebten.

Genotyp	Patienten n = 65	Überlebende n = 44	Verstorbene n = 21	Sepsis n = 28	MOD n = 23	Normalkollektiv n = 32
Homozygot PAI-1 5G/5G [Gruppe 1, Patienten, %]	13 [21,3%]	11	2	1	1	13 [40,6%]
Heterozygot PAI-1 4G/5G [Gruppe 2, Patienten, %]	32 [47,5%]	25	7	10	6	14 [43,8%]
Homozygot PAI-1 4G/4G [Gruppe 3, Patienten, %]	20 [31,1%]	8	12	17	16	5 [15,6%]

Tabelle 14: Verteilung der PAI-1-Genotypen.

Bezogen auf die Variablen Prognose (Outcome), Sepsis und Multiorganversagen waren die PAI-1-Genotypen PAI-1/4G//PAI-1/4G, PAI-1/4G//PAI-1/5G und PAI-1/5G//PAI-1/5G signifikant unterschiedlich verteilt. Posttraumatisch entwickelten PAI-1/4G homozygot typisierte Patienten signifikant häufiger eine Sepsis ($p=0,0001$) und ein Multiorganversagen ($p=0,0001$). Zwölf von 20 PAI-1/4G homozygoten Patienten verstarben ($p<0,05$).

Outcome	PAI-1 4G/4G	PAI-1 4G/5G	PAI-1 5G/5G	Summe
Überlebt	8[42,1%]	25[72,4%]	11[84,6%]	44[67,7%]
Gestorben	12[57,9%]	7[27,6%]	2[15,4%]	21[32,3%]
Summe	20	32	13	65

Chi-Quadratkoeffizient: $\chi^2=7,325$ mit $p=0,0284$

Tabelle 15: Patienten verstorben/überlebt (Prozentwerte sind Prozentwerte der Spalten).

Sepsis	PAI-1 4G/4G	PAI-1 4G/5G	PAI-1 5G/5G	Summe
Septisch	17[85%]	10[31,3%]	1[7,7%]	28[43,1%]
keine Sepsis	3[15%]	22[68,8%]	12[92,3%]	37[56,9%]
Summe	20	32	13	65

Chi-Quadratkoeffizient: $\chi^2 = 16,708$ mit $p = 0,0001$

Tabelle 16: Sepsis (Prozentwerte sind Prozentwerte der Spalten).

MOD	PAI-1 4G/4G	PAI-1 4G/5G	PAI-1 5G/5G	Summe
MOD $\geq 10^*$	16[80%]	6[18,8%]	1[7,7%]	23[35,4%]
MOD $< 10^{**}$	4[20%]	26[81,2%]	12[92,3%]	42[64,6%]
Summe	20	32	13	65

Chi-Quadratkoeffizient: $\chi^2 = 21,017$ mit $p = 0,0001$

* MOD-Wert bei wenigstens einem der 15 Zeitpunkte größer oder gleich zehn

** MOD-Wert bei allen Zeitpunkten kleiner als zehn

Tabelle 17: MOD (Prozentwerte sind Prozentwerte der Spalten).

Das Ergebnis zeigt für homozygote Patienten für die Allele PAI-1/4G einen signifikant ungünstigeren posttraumatischen Krankheitsverlauf als für PAI-1/4G//5G heterozygote Patienten sowie PAI-1/5G homozygote Patienten ($p < 0,01$). Ein Multiorganversagen entwickelten 16 PAI-1/4G homozygote Patienten. 84,2 % der PAI-1/4G homozygoten Patienten entwickelten eine Sepsis ($p > 0,05$, siehe Tabelle 14).

3.4 Ergebnisse der immunologischen Messparameter der genotypisierten Patienten

Die Daten der PAI-1-Plasmaspiegel, der Gewebefibrinogen-Aktivator (t-PA-Ag), der „Transforming Growth Factor beta“ (TGF β) sowie die Werte der proinflammatorischen Zytokine TNF-alpha und IL-1 beta wurden, geordnet nach der Allelausprägung des PAI-1-Gens eines Patienten, in je einer von drei Genotypgruppen zusammengefasst. Da die Daten der Plasmaspiegel nicht normalverteilt waren, wurden sie einer logarithmischen Transformation unterzogen.

Gruppierte man die Patienten analog den PAI-1-Genotypen, so hatten die PAI-1/4G homozygoten Patienten (Gruppe 3) die signifikant höchsten PAI-1-Plasmaspiegel und die höchste Inzidenz posttraumatischer Komplikationen.

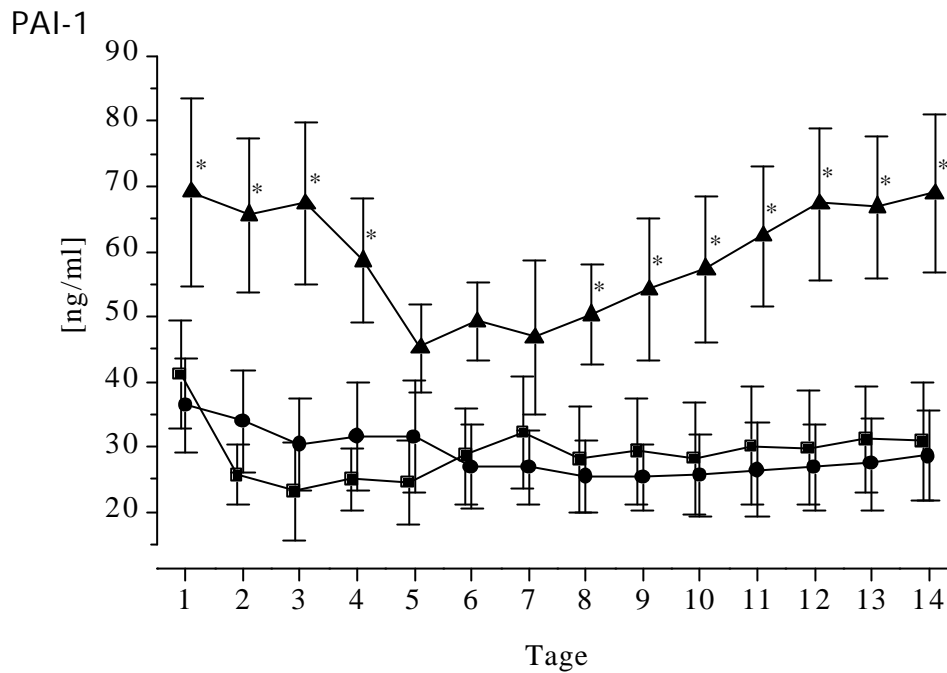


Abbildung 12: Plasmaspiegel PAI-1. Die Abbildung zeigt Patienten der Gruppe 3 (? , Homozygot PAI-1 4G/4G, n=20) im Vergleich zu Patienten der Gruppe 2 (●, PAI-1 4G/5G, n=32) und Patienten der Gruppe 1 (■, PAI-1 5G/5G, n=13).

Es konnte von den im Rahmen der PAI-1-Genotypisierung erfassten Mediatoren zwar für Fibrinogen ($p=0,029$) und den immunsuppressiv wirkenden „Transforming Growth Factor beta“ (TGF β) ($p=0,01$), nicht aber für den Gewebepasminogen-Aktivator (t-PA-Ag) und weitere proinflammatorische Zytokine (TNF α , IL-1 β) eine deutliche Differenz erfasst werden.

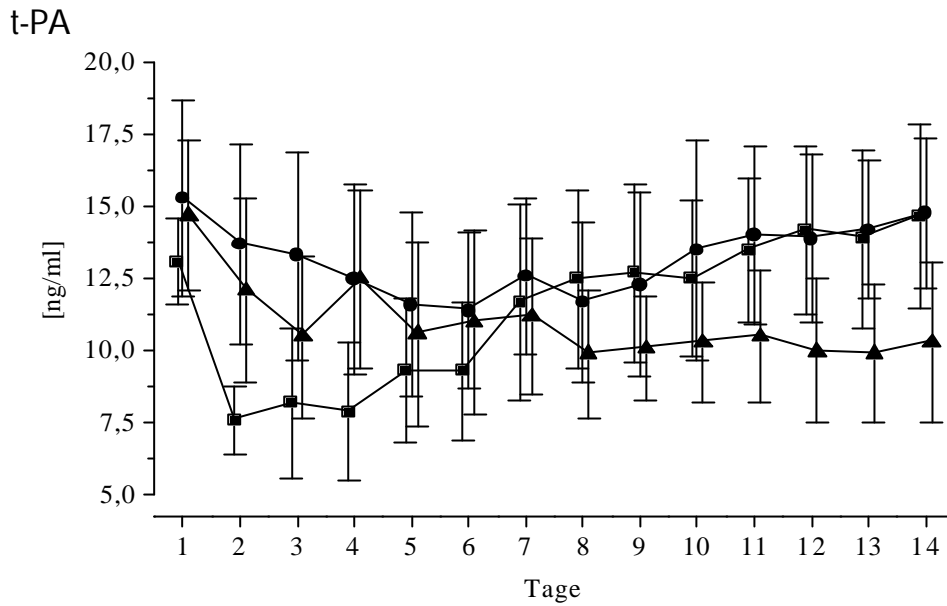


Abbildung 13: Plasmaspiegel t-PA. Die Abbildung zeigt Patienten der Gruppe 3 (? , Homozygot PAI-1 4G/4G, n=20) im Vergleich zu Patienten der Gruppe 2 (●, PAI-1 4G/5G, n=32) und Patienten der Gruppe 1 (■, PAI-1 5G/5G, n=13).

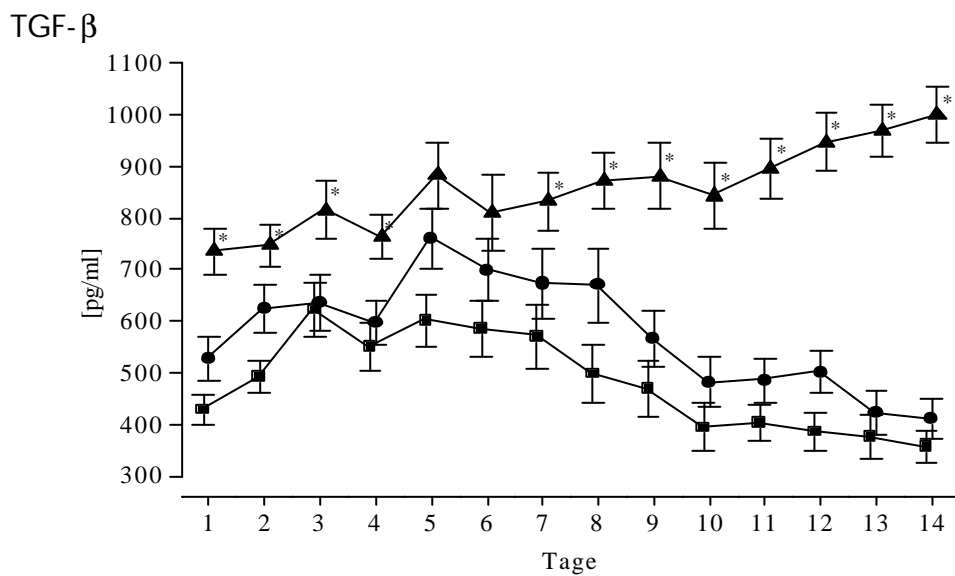


Abbildung 14: Plasmaspiegel TGF-beta. Die Abbildung zeigt Patienten der Gruppe 3 (? , Homozygot PAI-1 4G/4G, n=20) im Vergleich zu Patienten der Gruppe 2 (●, PAI-1 4G/5G, n=32) und Patienten der Gruppe 1 (■, PAI-1 5G/5G, n=13).

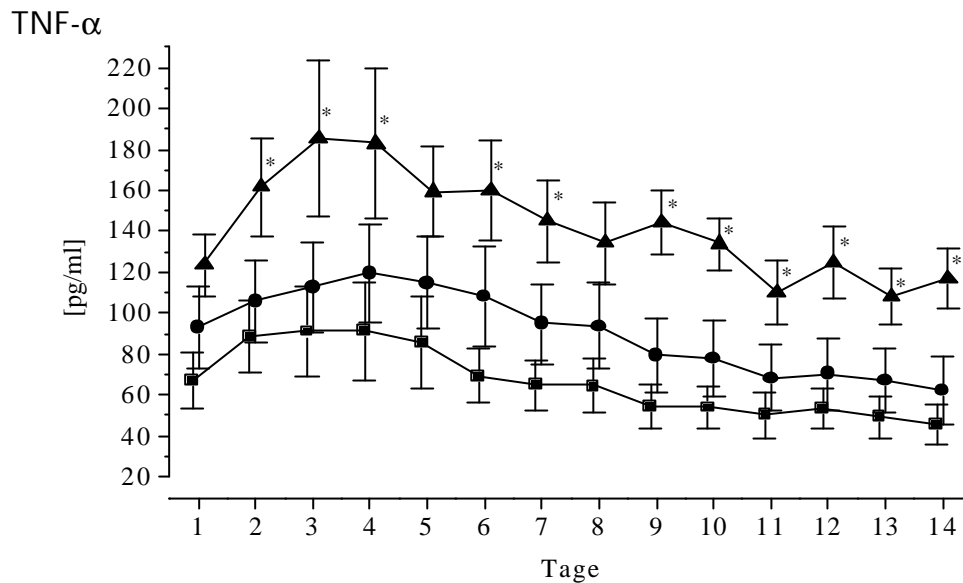


Abbildung 15: Plasmaspiegel TNF-alpha. Die Abbildung zeigt Patienten der Gruppe 3 (? , Homozygot PAI-1 4G/4G, n=20) im Vergleich zu Patienten der Gruppe 2 (●, PAI-1 4G/5G, n=32) und Patienten der Gruppe 1 (■, PAI-1 5G/5G, n=13).

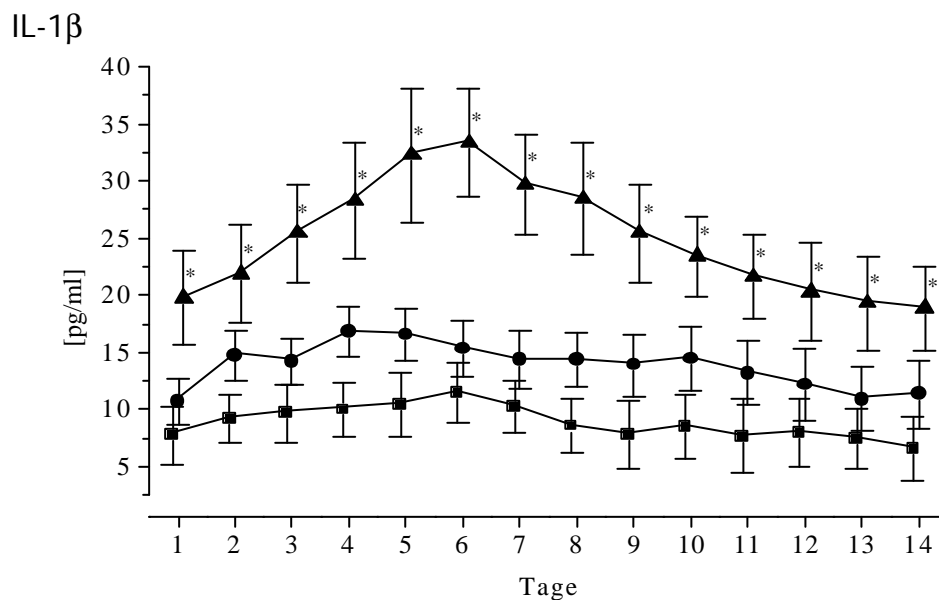


Abbildung 16: Plasmaspiegel IL-1 beta. Die Abbildung zeigt Patienten der Gruppe 3 (? , Homozygot PAI-1 4G/4G, n=20) im Vergleich zu Patienten der Gruppe 2 (●, PAI-1 4G/5G, n=32) und Patienten der Gruppe 1 (■, PAI-1 5G/5G, n=13).

Variable / Faktor	Faktor PAI-1 4G/5G
Fibrinogen	p=0,029*
Plasminogen	p=0,099
PAI-1	p=0,001**
t-PA-AG	p=0,787
TNF-alpha	p=0,404
TNF-R1	p=0,252
TNF-R2	p=0,125
IL-1beta	p=0,323
IL-2	p=0,526
IL-2 R	p=0,159
IL-6	p=0,749
IL-8	p=0,239
IL-10	p=0,260
TGF-beta	p=0,010*
PGE2	p=0,355

* = signifikant unterschiedlich sind die Gruppen PAI-14G/4G und PAI-15G/5G

** = signifikant unterschiedlich sind die Gruppen PAI-14G/4G und PAI-15G/5G sowie PAI-14G/4G und PAI-15G/5G

Tabelle 18: PAI-1-Messwiederholungsstudie (erste 14 Zeitpunkte); Tests beziehen sich auf die logarithmierten Werte; t-Test der Mittelwerte über die Zeit.

Homozygote Patienten für das Allel PAI-1/4G hatten signifikant höhere PAI-1-Plasmaspiegel als heterozygote und PAI-1/5G homozygote Patienten ($p < 0,01$).

Das Allel PAI-1/4G korrelierte mit einer signifikant höheren Mediatorenfreisetzung. Für den einzelnen polytraumatisierten Patienten bestand eine Assoziation zwischen der individuellen Genotyp-Konstellation und der Schwere des posttraumatischen Krankheitsverlaufes. In Abhängigkeit von der Allelausprägung des einzelnen Genotyps war das Risiko, posttraumatisch Komplikationen wie Sepsis und Multiorgandysfunktionen zu entwickeln, unterschiedlich hoch. Der individuellen Typisierung des einzelnen Patienten entsprach eine unterschiedliche Wahrscheinlichkeit, das posttraumatische Krankheitsgeschehen zu überleben.

3.5 Risikoabschätzung des einzelnen Patienten

Das Risiko des einzelnen Genotyps konnte mittels inferenzstatistischer Methoden (logistische Regression) beurteilt werden, indem das Risiko des einzelnen Patienten aufsteigend nach Vorkommen des Prognosefaktors „verstorben“ codiert wurde. Unter Berücksichtigung des zugrundeliegenden Genotyps schätzte man die Wahrscheinlichkeit

des Auftretens des Ereignisses „Patient verstirbt“ (Odds, siehe Abschnitt 2.5.2). Ausgehend von den Ergebnissen der Studie war die Allelausprägung PAI-1/5G//5G der Genotyp mit dem retrospektiv am geringsten zu erfassenden Risiko zu versterben. Für den Genotypen PAI-1/5G//5G wurde der Basiswert errechnet. Die Erhöhung des Risikos bei Veränderungen des Genotyps wurde bewertet, indem der Basiswert mit dem spezifischen Faktor (Multiplikator) des einzelnen Genotyps multipliziert wurde [91].

Die Multiplikatoren zur Abschätzung des Risikos sind in folgender Tabelle angeführt:

	Code	
	2	3
PAI-1 4G/5G Genotyp	2,0946	7,5601

Tabelle 19: Multiplikatoren zur Risikobeurteilung.

Die Existenz des homozygoten Genotyps PAI-1/4G//4G= 44 vergrößert nach diesem Verfahren das Risiko um das 3,8fache (PAI-1 4G) gegenüber dem Basiswert für den einzelnen Patienten. In Prozentzahlen beschrieben ist das Risiko für PAI-1/4G homozygote Patienten gegenüber homozygoten PAI-1/5G Patienten um 57,9 % erhöht, an den Folgen der Verletzungen im weiteren Verlauf zu versterben.

PAI-Code	Anzahl	Davon verstorben	Verstorben in %	Odds	P [Patient verstirbt]	Verhältnis P/Basiswert
55	13	2	15,4	0,182 [Basiswert]	0,154 [Basiswert]	1
45	29	8	27,6	0,381	0,276	1,791
44	19	11	57,9	1,376	0,579	3,76

Tabelle 20: Risikoskala des PAI-1-Genotyps.

Das Auftreten des Genotyps PAI-1 4G/4G ist assoziiert mit der systemisch und in einzelnen Kompartimenten vermehrt freigesetzten Menge an PAI-1. Darüber hinaus ist das Auftreten dieses Genotyps mit einer sehr viel schlechteren Prognose dieser Patienten verbunden.

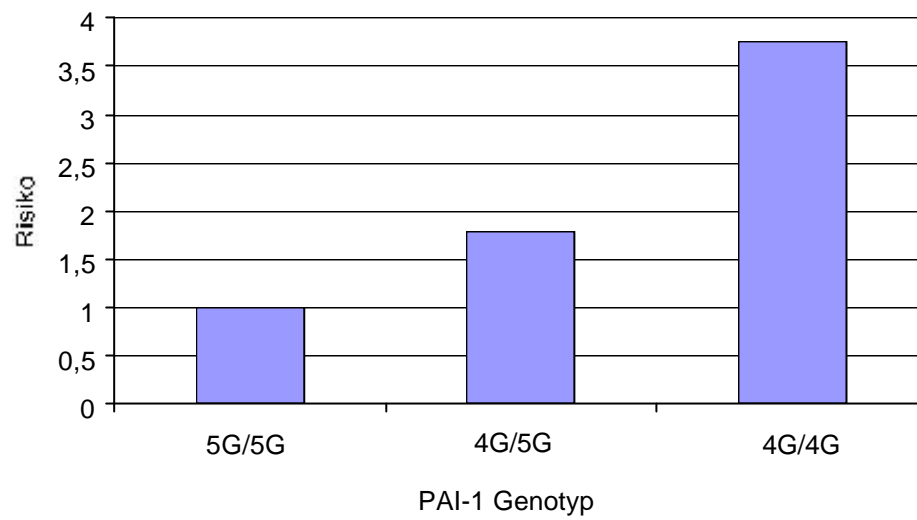


Abbildung 17: Graphische Darstellung des Risikos der polytraumatisierten Patienten. Die Einteilung ergibt sich aus der Gruppierung nach dem PAI-1 Genotypen.

4 Diskussion

Seit vielen Jahren ist man bemüht, die molekularen Zusammenhänge von Sepsis, septischem Schock und verwandten Krankheitsbildern zu entschlüsseln, um zu neuen, wenn möglich kausalen therapeutischen Interventionsmöglichkeiten zu kommen. Die biochemische und molekularbiologische Grundlagenforschung hat in den letzten Jahren eine Reihe pathophysiologischer Schritte innerhalb der Ereignisabfolge, die zur Sepsis führt, aufgedeckt [16,128,178,195,155]. Die destruktiven Komponenten der proinflammatorischen Wirtsantwort unterliegen bei regelhaftem Entzündungsablauf wirksamen Kontrollmechanismen. Unkontrolliert können sie eine eigene Wertigkeit mit einem entzündungsbedingten Letalitätsbeitrag entwickeln [82,100,140,150,86,123,132].

Die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$) und Serinproteasen (PAI-1) ist absolut notwendig, damit sich der Organismus adäquat auf die Auseinandersetzung mit einer Noxe (Trauma) und die Regeneration nach einer Organschädigung einstellen kann [39,98,118,151,83,104,133]. Bei individuell sehr unterschiedlich ausgeprägter immunologischer Reagibilität gilt deshalb die absolute Höhe von Plasmaspiegeln einzelner Mediatoren, trotz großer individueller Schwankungsbreite, als ein wesentliches Maß der Erkrankungsintensität [20,31,82,100,30,69,86]. Die nach einem Trauma einsetzende Störung der Immunfunktionen korrespondiert häufig mit einem Versagen der endogenen Defensivsysteme und damit einem Unvermögen, die sekundären Auswirkungen eines Hochrasanztraumas zu kompensieren und ein Überleben zu sichern [28,80]. In der Studie spielte nicht der frühe, sondern der späte Tod nach Trauma mit der Hauptkomponente des Multiorganversagens die führende Rolle und war die eigentliche Limitierung der Polytraumabehandlung.

Das in der Literatur bis dato nicht endgültig gelöste Problem der Sepsisdiagnose wurde auf verschiedenen Wegen parallel adressiert. Die subjektive, erfahrungsgebundene Einschätzung einer septischen Reaktion wurde prospektiv am Krankenbett erhoben und mit einer modifizierten, retrospektiv erstellten Sepsisdefinition verglichen [181,180,116,141,182].

Bei der Betrachtung der Scores zu Organfunktionsstörungen war eine allgemeine, traumabedingte Beeinträchtigung einzelner Organfunktionen zu beobachten, die im Laufe

der Zeit eine Tendenz zur Normalisierung zeigte. Bei den Patienten, die eine Sepsis entwickelten, wurde diese Tendenz zur Konsolidierung jedoch unterbrochen und führte zur Entwicklung eines Immundefektsyndroms mit zunächst auftretenden Einschränkungen einzelner Organsysteme. Setzte sich diese Entwicklung fort, kam es zur Dysfunktion mehrerer Organsysteme. Diese ließ sich anhand der Beurteilung der verwendeten Score - Systeme gut nachvollziehen. Tatsächlich liess sich durch die Scores zu MODS/MOV eine traumabedingte Organschädigung nachweisen, die durch eine sekundäre septische Reaktion richtungsweisend beeinflusst wurde [1,27,25,59,53].

Die bakteriologischen Untersuchungen der Studienpatienten konnten keine Differenz zwischen septischen und nicht septischen Patienten hinsichtlich der Keimzahl, des Keimspektrums und der Resistenzlage nachweisen, wohl aber eine teilweise ausgeprägte Kolonisation, was eine pathogene Relevanz der nachgewiesenen Keime in Frage stellt. Hierzu muss berücksichtigt werden, dass die Patienten zu über 80 % der Behandlungstage antibiotisch abgedeckt waren. Eine Begleiterscheinung im septischen Geschehen erscheint unter diesen Gesichtspunkten eher unwahrscheinlich. Im Einklang mit anderen Studien unterschieden sich die Patientengruppen allein durch die septische Reaktion und nicht durch das Keimspektrum [98].

Zeigte sich die Entwicklung eines MODS unter Umständen erst nach einer gewissen Latenzzeit durch das Ausbleiben der Normalisierung der Organfunktion, waren bereits einige klinische Parameter (Hämodynamik, Oxygenierung) in der Gruppe der später verstorbenen septischen Patienten schon 24 Stunden nach dem Trauma signifikant verändert [23]. Die Unterschiede für gerinnungsphysiologische wie auch immunologische Parameter zwischen den einzelnen Gruppen sprechen für eine generelle Erschöpfung des Immunsystems zu Beginn der septischen Reaktion bei Patienten, die einen komplizierten Krankheitsverlauf entwickelten und gehäuft verstarben [97].

Verschiedene, zunächst vielversprechende Versuche wurden bereits unternommen, um den überschießenden inflammatorischen Abläufen des traumatisch beeinträchtigten Organismus zu begegnen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte nur eine einzige klinische Studie bei septischen Patienten mit grampositiven und gramnegativen Infektionen allgemein gültige, klinisch relevante und reproduzierbare therapeutische Vorteile aufzeigen [17,18]. Andere Ansätze, unabhängig davon, ob monoklonale Anti-LPS-Antikörper (AK), lösliche TNF-Rezeptor-AK, IL-1 β -Rezeptorantagonisten oder aber Anti-TNF-AK

(MAK 195F) und PAF-Antagonisten (Ginkgolid B) verabreicht wurden, zeigten nicht das erwünschte Ergebnis [158,2].

Es ist nach wie vor unklar, ob eine schwere Mehrfachverletzung mit der nachfolgenden inflammatorischen Reaktion alleine zur Ausbildung eines Multiorganversagens ausreicht, oder ob ein bakterieller Stimulus den traumabedingten Vorschaden in synergistischer Weise, im Sinne eines Kofaktors, verstärkt. Die Beweisführung für eine rein inflammatorische, aseptische Reaktion als Auslöser wird bei bestehenden, unumgänglichen Keimbesiedlungen des Patienten schwierig sein. Es ist ein pathogenetisches Konzept vorstellbar, dass den septischen Insult und das Trauma gleichbedeutend in der Induktion von Störungen des oxidativen zellulären Metabolismus sieht, entweder durch direkte Zellschädigung oder indirekt über eine Aktivierung von Phagozyten und deren Schädigungspotenzial. Durch die zelluläre Funktionsstörung kommt es zu einem Permeabilitätsschaden der Zellmembran. Analog zu dem bekannten Symptomkomplex der lokalen Entzündung Rubor, Calor, Dolor, Tumor und Functio laesa ist der Ablauf des Multiorganversagens, der zunächst einzelne Organsysteme erfasst und bei ausbleibender Therapie oder Versagen der eingeleiteten Therapie immer weiter um sich greift. Es kommt über eine Ödementwicklung zu einer Organfunktionsstörung mit oder ohne Infektion, die, wenn sie längere Zeit nicht therapeutisch beherrscht werden kann, in eine irreversible autodestruktive Entzündung mit einem Multiorganversagen als dem gemeinsamen Endpunkt mündet [2,59,197].

Es ist zu beachten, dass das Immunsystem des einzelnen Patienten auf ein Trauma sehr unterschiedlich reagiert. Es stellt sich deshalb die Frage, inwiefern die für einzelne Patienten existierende, gesteigerte, immunologische Reaktivität auf ein Trauma als eine überschießende, unkontrolliert imponierende Entzündungsreaktion oder als notwendige, adäquate, immunologische Reaktion, unabhängig von einzelnen Verletzungen, zu bewerten ist. Weiterhin ist offen, ob diese immunologische Abwehrreaktion gegenüber der Noxe per se als fixe Reagibilität zu sehen ist, die auf Polymorphismen in Genen pro- und antiinflammatorischer Mediatoren und deren unterschiedlichen Expression sowie nachgeordneten Proteinbiosynthesen basiert [16,86,100,123,128,132,140,150,155,178,195]. Die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$) und der Serinprotease (PAI-1) ist sowohl notwendig zur adäquaten Auseinandersetzung des Organismus mit einer Noxe als auch für die Regeneration nach einer Organschädigung [20,34,46,51,60,83,98,104,118,133,151]. Trotz individuell

sehr unterschiedlich ausgeprägter immunologischer Reagibilität des Organismus mit großer individueller Schwankungsbreite und daraus resultierend fehlenden „Normwerten“ gilt die absolute Höhe von Plasmaspiegeln einzelner Mediatoren als ein wesentliches Maß der Erkrankungsintensität [20,31,82,100,30,69,86]. Bei septischen Patienten kann eine gesteigerte Expression des $\text{TNF}\alpha$ - und $\text{IL-1}\beta$ -Gens von hohen $\text{TNF}\alpha$ - und $\text{IL-1}\beta$ -Plasmaspiegeln abgeleitet werden, wobei insbesondere Patienten, die versterben, signifikant höhere Plasmaspiegel entwickeln [28,47,39]. Aus in-vitro-Untersuchungen ist bekannt, dass sich beide Zytokine in ihrer Wirkung gegenseitig verstärken [19,147,172,187,149]. Sowohl $\text{TNF}\alpha$ als auch $\text{IL-1}\beta$ fördern in synergistischer Weise die Transkription des PAI-1-Gens und damit die Synthese und systemische Freisetzung von PAI-1 direkt über eine Signalkaskade, dessen Endglied, der Transkriptionsfaktor nF-kappa-beta , die Transkriptionsrate in der Promotorregion des PAI-1-Gens steuert [79,172,203,149,171].

Nach einem Trauma ist die Fibrinolyse initial gesteigert und ihr folgt als Reaktion durch eine gesteigerte PAI-1-Synthese eine systemische Fibrinolysehemmung [34,205,172]. Aufgrund dieser zeitlichen Abfolge hängt die fibrinolytische Aktivität nach einem Trauma in hohem Maße von der plasmatischen PAI-1-Aktivität ab [34]. Wie bei den proinflammatorischen Zytokinen $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ konnte ein Zusammenhang zwischen unterschiedlichen PAI-1-Plasmaspiegeln und genetischen Variationen des PAI-1-Gens aufgezeigt werden [87,127,159,177,207,194,137,154,173]. Im Vergleich zu den 32 PAI-1/4G//PAI-1/5G heterozygoten und 13 PAI-1/5G homozygoten Patienten war für die 20 PAI-1/4G homozygoten Patienten eine niedrigere Fibrinolyseaktivität nachweisbar. In ihrer Größenordnung variabel, war sie über den Untersuchungszeitraum insgesamt konstant reduziert. Dies bedeutet für einen polytraumatisierten, PAI-1/4G homozygot typisierten Patienten, mit einem hohen Anteil an geschädigtem Weichteilgewebe ein kritisch eingeschränktes Vermögen, bestehende Mikrothromben (durch eine zunächst gesteigerte Gerinnungsaktivität) aufzulösen. Dies könnte das nach einer Weichteiltraumatisierung nachweisbare Phänomen erklären, dass kapilläre Stromgebiete in geschädigten Arealen nur eingeschränkt perfundiert werden und oft nur sehr verzögert, stark reduziert oder gar nicht wieder revaskularisiert werden. Lokal bedeutet dies für den Patienten eine massive Einschränkung der Mikrozirkulation mit einer verstärkten Hypoxie, weiter eskalierenden Zell- und Gewebeschäden sowie eine exazerbierende Freisetzung weiterer Mediatoren [191,197,198,166,168].

Bezogen auf die Gruppenmittelwerte der Plasmaspiegel für $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ konnten keine signifikanten Differenzen für die nach PAI-1-Genotypen gruppierten 65 Studienpatienten nachgewiesen werden. Als mögliche Erklärung könnte die zumindest partiell zugleich existierende immunsuppressive $\text{TGF}\beta$ -Wirkung dienen [35,79,99,124,131,192,65,85,111,113,165], dessen Plasmaspiegel bei PAI-1/4G homozygoten Patienten signifikant erhöht war. Beispielhaft für die Interaktion zwischen proinflammatorischen ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$) und antiinflammatorischen Mediatoren ($\text{TGF}\beta$) spiegeln die Daten exemplarisch die Komplexität wieder. Dieser zunächst scheinbare Widerspruch kann über die immunologische Funktion des $\text{TGF}\beta$ erklärt werden. $\text{TGF}\beta$ wirkt inhibierend auf Fc^+ -aktivierte Makrophagen und die $\text{Th}_1(\text{CD4}^+)$ -Lymphozytensubpopulation [112,113,124,126,130]. Eine posttraumatisch vermehrte Freisetzung von $\text{TGF}\beta$ aus über $\text{TNF}\alpha$ aktivierten Fc^+ -Makrophagen vermindert die weitere $\text{TNF}\alpha$ - und $\text{IL-1}\beta$ -Freisetzung aus diesen Zellen im Sinne einer Rückkopplung. Es resultiert durch eine verminderte $\text{TNF}\alpha$ - und $\text{IL-1}\beta$ -Aktivierung der $\text{Th1}(\text{CD4}^+)$ -Lymphozytensubpopulation ein weiterer Abfall der von diesen Zellen freigesetzten proinflammatorischen Mediatoren ($\text{TNF}\alpha$, IL-1 , IL-6 und IL-8). Auf die proinflammatorische Aktivierung wirkt $\text{TGF}\beta$ insgesamt als physiologisch begrenzendes Regulativ [126, 144,164,165,192]. Trotzdem entwickelten PAI-1/4G homozygote Patienten nicht nur die höchsten PAI-1-Plasmaspiegel, sondern auch die höchsten $\text{TNF}\alpha$ - und $\text{IL-1}\beta$ -Werte. Hieraus lässt sich vermuten, dass erhöhte $\text{TNF}\alpha$ - und $\text{IL-1}\beta$ -Werte bei PAI-1/4G homozygoten Patienten als eine systemisch überschießende, unkontrollierte Entzündungsreaktion anzusehen sind. Diese Überreaktion der immunologischen Antwort und die generell beeinträchtigte Fibrinolyse, als Antwort auf ein stattgehabtes Trauma, führten als Resultat unserer Untersuchung für PAI-1/4G homozygote Patienten signifikant häufiger als für PAI-1 heterozygote und PAI-1/5G homozygote Patienten zu einem komplikationsträchtigen Krankheitsverlauf [33,38,42,132,150]. Die hier beschriebene, stark eingeschränkte Fibrinolyse für PAI-1/4G homozygote Patienten mag der ursächliche Faktor sein, dass kritische, aber noch kompensierte und damit reversible Organfunktionsstörungen in morphologische Organschäden und Funktionsausfälle mündeten [166,195,197]. Der posttraumatische Prozess PAI-1/4G homozygoter Patienten wird geprägt durch eine kontinuierlich eingeschränkte Fibrinolyse, eine gesteigerte immunsuppressive Aktivität ($\text{TGF}\beta$, PGE_2) und eine zugleich abgestufte proinflammatorische Wirkqualität und könnte somit die signifikant erhöhte Inzidenz von Sepsis und

MOD erklären [168,172,174,177,197,205,211]. Ebenso konnte die signifikant unterschiedliche Häufung septisch-toxischer Komplikationen und multipler Organfunktionsstörungen für die nach PAI-1-Genotypen geordneten Patienten in einer signifikanten Differenz der Risikoabwägung gezeigt werden. Sie resultierte mit 57,9 % in einem um über 40 % erhöhten Risiko für PAI-1/4G homozygote Patienten, ihre Verletzungen nicht zu überleben, gegenüber PAI-1/5G homozygoten Patienten (15,4 %) [91].

Soweit anamnestisch in Erfahrung gebracht werden konnte, hatten alle in die Studie einbezogenen polytraumatisierten Patienten vor dem Unfallereignis einen unbeeinträchtigten Gesundheitszustand. Festzuhalten bleibt, dass eine Vielzahl von Faktoren, die bei einem kritisch Kranken auf die Genexpression und Transkriptionsrate eines einzelnen pro- wie auch antiinflammatorischen Mediators einwirken, berücksichtigt werden muss [82]. Dies gilt auch für die Beurteilung von Polymorphismen, d.h. verschiedener Allele einzelner Gene im Vergleich zum Krankheitsverlauf. Die Steigerung der Transkriptionsrate eines Gens kann durch sehr unterschiedlich organisierte, intrazelluläre enzymatische Signalkaskaden ablaufen [7,65,79,206,196]. Die initialen Stimuli können dabei durchaus sehr differieren. Einzelnen Genotypen können als funktionelle „High-“ bzw. „Low-Responder“ theoretisch, abhängig von der damit quantitativ freigesetzten zirkulierenden Mediatorenmenge und deren biologischen Effekten, sehr unterschiedliche Einflüsse auf einen Krankheitsverlauf zugeschrieben werden [127]. Die qualitativen Effekte können daneben auch von den zellulären Strukturen und dem Kompartiment abhängen, in dem der Fokus des entzündlichen Prozesses einerseits und die Aktivierung des immunologischen Prozesses andererseits initial startet [197]. Zusätzlich kann die Expression eines Gens nach Stimulation beim einzelnen Patienten durch benachbarte Gene (z.B. HLA-Gene) beeinflusst sein. Solche Gene können direkt die Transkription steigern oder aber posttranskriptionell Einfluss auf die Mediatorsynthese nehmen [16].

Die biologische Wirkung proinflammatorischer Zytokine ist im Kontext der Interaktionen pro- und antiinflammatorischer Zytokine zu sehen, die bei septischen polytraumatisierten Patienten in einem komplex organisierten Netzwerk interagierender Mediatoren das ausufernde Entzündungsgeschehen prägen. Dies wird exemplarisch in einer Studie von Westendorp et al. deutlich [201]. Patienten mit einer Meningokokkeninfektion und einer in vitro gering ausgeprägten TNF α -Synthese hatten ein zehnfach erhöhtes Risiko, an dieser Infektion zu versterben. Dieses Risiko erhöhte sich auf das Zwan-

zigfache, wenn in vitro gleichzeitig eine gesteigerte IL-10-Synthese vorlag [4,138,119]. Das Ergebnis legt nahe, zumindest auf einem jeweils eng umschriebenen Teilbereich des immunologischen Netzwerkes (z.B. proinflammatorische Zytokine) nicht einen einzelnen Einflussfaktor, sondern möglichst viele Mediatoren und ihre Allelverteilung für eine Patientenklientel gleichzeitig zu erfassen. Dieser Vorstellung steht zur Zeit der noch sehr begrenzte Kenntnisstand über die Existenz von Genpolymorphismen im Genlocus einzelner pro- und antiinflammatorischer Mediatoren entgegen [16]. Zudem stehen die Arbeiten zur Qualität des Einflusses einzelner schon bekannter Genpolymorphismen pro- und antiinflammatorischer Zytokine (TNF α , TNF β , IL-1, -2, -2r, -6, -8, -8r (CCR5), -10, PAI-1 und TFPI) auf ein definiertes Krankheitsgeschehen wie die Sepsis, das Leberversagen und verschiedener Autoimmunerkrankungen erst ganz am Anfang [31,32,37,40,49,52,54,61,74,75,76,96,97,105].

Möglicherweise ist das Erfassen von definierten Allelen einzelner, das Bild einer systemischen Entzündungsreaktion prägender Mediatoren als genetische Risikofaktoren eine vielversprechende Basis für erfolgreichere therapeutische Bemühungen um kritisch kranke Patienten [151]. Voraussetzung hierfür sind aber ein noch umfassenderes Verständnis der Rolle des einzelnen Zytokins im Entzündungsgeschehen einerseits und verbesserte Kriterien für eine Diskriminierung von Patientensubpopulationen andererseits. Erst dann sollte modulierend zum Schutz und zur Unterstützung der immunologischen Abwehrfunktionen in das Entzündungsgeschehen eines Patienten eingegriffen werden, da der bisherige Misserfolg immunmodulatorischer Therapiestrategien eng mit der mangelhaften Diskriminierung geeigneter Patientensubpopulationen verknüpft ist [63]. In diesem Sinne ist die Genomanalyse des PAI-1-Genlocus eine Möglichkeit der verbesserten Risikostratifizierung sepsisgefährdeter Patienten. Zusätzlich ist die Genotypisierung ein zusätzliches Instrument in der derzeit verfügbaren molekularbiologischen Diagnostik, welches neue Informationen zum Verhalten des Immunsystems in der Dynamik des septischen Prozesses bietet [135,151,133]. Das Auftreten der Allele PAI-1/4G ist assoziiert mit der systemisch in Kompartimenten und der Zirkulation vermehrt freigesetzten Menge an TNF α , IL-1 β und PAI-1. Diese gewährt eine präzisere Definition von Zielparametern, indem sie Hochrisikopatienten diskriminiert [135].

Die Genotypisierung des Patienten unter Berücksichtigung der damit verbesserten Diskrimination von „High“- und „Low-Respondern“ mag eine Basis bereiten, mittels einer verbesserten Risikostratifizierung den interventionellen Therapiestudien mit höherer

Wahrscheinlichkeit nur noch solche Patienten zuzuführen, die von einer solchen Therapie profitieren [16]. Gleichzeitig könnten „Low-Responder“ besser von solchen Therapieinterventionen ausgeschlossen werden, um so eine ungewollte therapeutisch verursachte Immunsuppression zu vermeiden, deren schädigendes Potenzial etwa genauso hoch wie das einer unkontrollierten Hyperinflammation zu veranschlagen ist [2,135,115].

Es ist zu hoffen, dass ein zu erwartendes umfassenderes Verständnis der genetischen Grundlagen der Entzündungsprozesse helfen kann, eine verbesserte Risikostratifizierung von Patienten schon zu Beginn der Erkrankung zu ermöglichen. Demzufolge ist auf der weiteren Suche nach gezielten vorbeugenden immunmodulatorischen Therapieansätzen zur Verbesserung der Prognose kritisch kranker Patienten die Genotypisierung pro- und antiinflammatorischer Mediatoren einzubeziehen und an entsprechenden Patientengruppen zu überprüfen[135,115]. Schließlich sollte zur Verbesserung der Prognose polytraumatisierter Patienten die frühzeitige Anwendung eines intensivmedizinischen bedarfsadaptierten, abgestuften Maßnahmenkataloges an Standardtherapiemaßnahmen so früh wie möglich beginnen. Nach der Entschlüsselung des menschlichen Genoms und der daraus resultierenden Hinwendung zur Funktionsanalyse der Gene, z.B. in der Bundesrepublik Deutschland im Rahmen des Nationalen Genomforschungsnetzwerkes (NGFN), ist heute zu erwarten, dass schon in naher Zukunft genetische Regulation von Krankheiten, u.a. von Sepsis, Multiorganversagen nach Trauma, besser und vollständiger in ihrer Gesamtheit verstanden werden können. Begünstigt wird dieser Prozess durch sich rasant entwickelnde biotechnologische Verfahren, z.B. dem in dieser Arbeit vorgestellten MALDI-TOF MS oder der Chip-Technologie, die vollautomatisiert Massenanalysen in kurzer Zeit erlauben. So wird sich zukünftig ein immunmodulatorischer Therapieansatz für polytraumatisierte Patienten ableiten lassen, dessen Vielfältigkeit und individualspezifische Komposition sich heute wohl nur erahnen lässt.

5 Zusammenfassung

Schwere Verletzungen führen zu einer tief greifenden Funktionsanomalie der körpereigenen humoralen und zellulären Abwehrsysteme. Die Ursachen für dieses pathologische Phänomen finden sich in der ausgeprägten Gewebeerstörung, im Durchlaufen eines hämorrhagischen Schocks und in der früh einsetzenden aggressiven Endotoxämie. Diese wird überwiegend durch eine bakterielle Translokation aus dem Gastrointestinaltrakt hervorgerufen. Dies zeigt sich bereits früh nach einem Trauma durch eine ungeordnete Zytokinsynthese als Ausdruck einer zellvermittelten Immunfunktionsstörung [80]. So kommt es nach initialer Stabilisierung eines polytraumatisierten Patienten oft zu einem Unvermögen der endogenen Defensivsysteme, die sekundären Auswirkungen eines Hochrasanztraumas zu kompensieren [62].

Die Scores zu Organfunktionsstörungen dokumentierten eine allgemeine, traumabedingte Beeinträchtigung einzelner Organfunktionen, die bei den meisten Patienten im Verlauf eine Tendenz zur Normalisierung zeigten. Diese Entwicklung wurde bei den septisch reagierenden Patienten unterbrochen und führte durch ein Immundefektsyndrom zur Dekompensation. Insofern lässt sich durch die Scores zu MODS/MOV eine traumabedingte Komponente der Organschädigung nachweisen, die durch eine sekundäre septische Reaktion richtungsweisend beeinflusst wird [2,59,53].

Die bakteriologischen Untersuchungen wiesen keine Unterschiede zwischen septischen und nicht septischen Patienten hinsichtlich der Keimzahl, des Keimspektrums und der Resistenzlage auf, was eine pathogene Relevanz der nachgewiesenen Keime deshalb in Frage stellt. Es muss aber berücksichtigt werden, dass die Patienten zu über 80 % der Behandlungstage antibiotisch abgedeckt waren. Die Patientengruppen der Studie unterschieden sich lediglich durch die septische Reaktion und nicht durch das Keimspektrum [98].

Die Gruppenunterschiede für gerinnungsphysiologische wie auch immunologische Parameter sprechen für eine generelle Erschöpfung des Immunsystems zu Beginn der septischen Reaktion in Patienten, die einen komplizierten Krankheitsverlauf entwickelten und gehäuft verstarben. Verschiedene Ansätze erscheinen geeignet, den überschießenden inflammatorischen Regelabläufen des geschädigten Organismus zu begegnen. Es

gilt zu verhindern, dass der Zustand einer systemischen inflammatorischen Reaktion bei einem immunsupprimierten Patienten in einen Zustand der Sepsis übergeht [28].

Unklar ist, inwieweit nach Polytrauma eine rein inflammatorische Reaktion zur Ausbildung eines Multiorganversagens ausreicht, oder ob ein bakterieller Stimulus den traumabedingten Vorschaden in synergistischer Weise verstärkt. Insofern ist ein pathogenetisches Konzept vorstellbar, bei dem der septische Insult und das Trauma gleichbedeutend in der Auslösung von Störungen des oxidativen zellulären Metabolismus sind. Dies kann durch direkte Zellschädigung erfolgen oder indirekt über eine Aktivierung von Phagozyten und deren Schädigungspotenzial. Die zelluläre Funktionsstörung zieht einen Permeabilitätsschaden der Zellmembran nach sich. Dies führt über eine Ödementwicklung zu einer Organfunktionsstörung mit oder ohne Infektion, welche, wenn sie über längere Zeit besteht, in eine irreversible, autodestruktive Entzündung mit einem Multiorganversagen als dem gemeinsamen Endpunkt mündet [197].

Innerhalb des komplexen Gebiets der präventiven Immunmodulation und im Hinblick auf die Kontrolle der autoaggressiven Immunfehlfunktionen sind einige wichtige Aspekte zu berücksichtigen. Die präventiven Interventionen sollten kontrolliert verschiedenste Zellsysteme schützen und auf diese Weise den verletzten Patienten sowohl vor der zellulären Hyperaktivierung als auch vor einer zellulären Erschöpfung (Verbrauchsimmunopathie) bewahren [59]. So kommt der Auswahl des geeigneten Patienten und des optimalen Zeitpunktes, an dem die Therapie begonnen werden sollte, besondere Bedeutung zu. Ein vollständiges Abschalten der inflammatorischen Reaktion ist hierbei zu vermeiden, da die Freisetzung pro- und antiinflammatorischer Zytokine und Serinproteasen für eine adäquate Auseinandersetzung des Organismus mit einer Noxe notwendig ist [2]. Aufgrund der Beobachtung, dass das Immunsystem des einzelnen Patienten auf ein Trauma sehr unterschiedlich reagiert, ist die Frage zu klären, inwiefern die für einzelne Patienten existierende gesteigerte immunologische Reaktivität auf ein Trauma als eine überschießende, unkontrolliert imponierende Entzündungsreaktion unabhängig von einzelnen Erkrankungen zu werten ist. Weiterhin bleibt offen, inwiefern diese immunologische Abwehrreaktion ein stetiges Reaktionsmuster gegenüber der Noxe ist, die als genetische Disposition gewertet werden kann.

Die PAI-1-Genotypisierung des Patienten bietet die Möglichkeit, Informationen zur Aktivierung, Interaktion und Dysbalance immunologischer Abläufe in der Dynamik des septischen Krankheitsverlaufes nach schwerer Mehrfachverletzung zu liefern

[16,151,133]. Die Existenz der Allele PAI-1/4G ist für einen polytraumatisierten Patienten assoziiert mit einer signifikant vermehrt freigesetzten Menge an $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und PAI-1 [128,178,155]. PAI-1/4G homozygote polytraumatisierte Patienten haben ein 3,8fach erhöhtes Risiko (57,9 %) gegenüber PAI-1/5G homozygoten polytraumatisierten Patienten, im septischen Multiorganversagen zu versterben [127]. Durch die PAI-1-Genotypisierung ist es möglich, Hochrisikopatienten gezielt zu erfassen. Unter diesen neuen Gesichtspunkten könnten interventionellen Therapiestudien nur solche Patienten zugeführt werden, die davon auch profitieren.

Neben den intensivmedizinischen Standardtherapiemaßnahmen gilt es, die Funktionseinschränkungen des Immunsystems genau zu identifizieren und zu quantifizieren. Die hieraus mögliche präzise Diskriminierung von Hochrisikopatienten ist zu berücksichtigen, um eine gezielte präventive immunmodulatorische Therapie den betroffenen Patienten zukommen zu lassen [2,16].

6 Abkürzungsverzeichnis

AaDO ₂	Alveolo-arterielle Sauerstoffdruckdifferenz
AIS	Abbreviated injury scale
APACHE	Acute physiology, age and chronic health evaluation
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
AVDO ₂	Arterio-venöse Sauerstoffdruckdifferenz
BIPAP	Biphasic positive airway pressure
C3a	Komplementfaktor 3 aktiviert
C5a	Komplementfaktor 5 aktiviert
CARS	Compensatory antiinflammatory response syndrome
CD	Cluster of differentiation (Zelloberflächenmoleküle)
CI	Cardiac Index
CPAP	Continuous positive airway pressure
CVVHD	Continuous Veno-Venous Hemodiafiltration
DIC	Disseminated intravascular coagulation
DNA	Desoxyribonucleic acid
DO ₂	Oxygen Delivery
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ELAM	Endothelial leukocyte adhesion molecule
ELISA	Enzym linked immunosorbent assay
FiO ₂	Inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FPA	Fibrinolytprodukt A
GCS	Glasgow coma scale
HF	Herzfrequenz
HI	Herzindex
HZV	Herzzeitvolumen
ICAM	Intracellular adhesion molecule
I/R	Ischämie/Reperfusion
ICU	Intensive care unit
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IL-1ra	IL-1 Rezeptorantagonist
ISS	Injury severity score

LAP	Linksatrialer Druck
LPB	Lipopolysaccharide binding protein
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichoic acid
LVSW	Linksventrikuläre Schlagarbeit
MAB	Monoclonal antibody
MAP	Mean arterial pressure
MARS	Mixed antagonist response syndrome
MODS	Multiple organ dysfunction syndrome
MOF	Multiple organ failure
MOV	Multiorganversagen
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
O ₂	Oxygen
PaCO ₂	Arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PaO ₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
PAF	Platelet activating factor
PAP	Pulmonary artery pressure
PAW	Pulmonalarterieller Verschlußdruck
PEEP	Positive end-expiratory pressure
PGE	Prostaglandine E
PMN	Polymorphonuclear leukocyte
PTS	Polytraumaschlüssel
PVR	Pulmonary vascular resistance
QS:QT	Pulmonales Shuntvolumen
RES	Retikulo-endotheliales System
RT	Raumtemperatur
RVSW	Rechtsventrikuläre Schlagarbeit
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SCHE	Serumcholinesterase
SGOT	Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
SGPT	Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SPSSx	Scientific package for the social sciences
SSS	Simplified severity score

SVR	Systemic vascular resistance
TAE	Tris-Ammonium-EDTA
TFPI	Tissue Factor-Pathway Inhibitor
TM	Thrombomodulin
TGF β	Transforming growth factor beta
TNF	Tumour necrosis factor
TPN	Total parenteral nutrition
VCAM	Vascular adhesion molecule
VO ₂	Oxygen consumption/uptake
WOB	Work of breathing
XO	Xantine Oxidase
ZNS	Zentralnervensystem
ZVD	Zentralvenöser Druck

7 Literaturverzeichnis

1. Aasen AO, Buo L. Activation of Humoral Systems. The Role of Coagulation, Fibrinolysis, and the Plasma Kallikrein-Kinin-System. In: Schlag G, Redl H, eds. Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1993;36-45.
2. Abraham E. Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis. *Intensive Care Med* 1999;25:556-566.
3. Anderson BO, Brown JM, Harken AH. Mechanisms of neutrophil-mediated tissue injury. *J.Surg.Res.* 1991;51:170-179.
4. Armstrong L, Jordan N, Millar A. Interleukin 10 (IL-10) regulation of tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax* 1996;51:143-149.
5. Ayala A, Meldrum DR, Perrin MM, Chaudry IH. The release of transforming growth factor-beta following haemorrhage: its role as a mediator of host immunosuppression. *Immunology* 1993;79:479-484.
6. Babcock GF, Rodeberg DA, White-Owen C. Changes in neutrophil function following major trauma or thermal injury. *Journal of Intensive Care Medicine* 1994;20:172-180.
7. Baer M, Dillner A, Schwartz RC, Sedon C, Nedospasov S, Johnson PF. Tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages is attenuated by an autocrine factor that preferentially induces NF-kappaB p50. *Mol.Cell Biol.* 1998;18:5678-5689.
8. Baker CC, Miller ID, Baue AE. Multi organ failure: Predictors of outcome. *J.Trauma* 1983;23:627-653.
9. Baker SP, O'Neill B. The injury severity score: an update. *J.Trauma* 1976;16:882-885.
10. Baker SP, O'Neill B, Haddon W, Long WB. The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. *J.Trauma* 1974;14:187-196.
11. Battistini B, Forget MA, Laight D. Potential roles for endothelins in systemic inflammatory response syndrome with a particular relationship to cytokines. *Shock* 1996;5:167-183.
12. Baue AE. The horror autotoxicus and multiple-organ failure. *Arch.Surg.* 1992;127:1451-1462.
13. Baue AE. MOF/MODS, SIRS: an update. *Shock* 1996;6 Suppl 1:S1-S5.
14. Baue AE. Multiple organ failure, multiple organ dysfunction syndrome, and systemic inflammatory response syndrome. Why no magic bullets? *Arch.Surg.* 1997;132:703-707.
15. Baue AE, Durham R, Faist E. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle? *Shock* 1998;10:79-89.
16. Bernal W, Donaldson P, Wenden J. Pro-Inflammatory Cytokine Genomic Polymorphism and Critical Illness. In: Vincent JL, ed. Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine. 1999;10-18.
17. Bernard GR, Hartmann DL, Helterbrand J, Fisher-CJ J. Recombinant human activated protein C (rhAPC) produces a trend toward improvement in morbidity and 28-day survival in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1999;27:A33.
18. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, for the Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) Study Group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N.Engl.J Med* 2001;344:699-709.
19. Bethea JR, Gillespie GY, Benveniste EN. Interleukin-1 beta induction of TNF-alpha gene expression: involvement of protein kinase C. *J.Cell Physiol* 1992;152:264-273.
20. Biffi WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM. Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Ann.Surg.* 1996;224:647-664.
21. Blasi F. uPA, uPAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways? *Immunol.Today* 1997;18:415-417.
22. Boldt J, Papsdorf M, Rothe MA. Changes of the hemostatic network in critically ill patients - is there a difference between sepsis, trauma, and neurosurgery patients? *Crit Care Med* 2000;28:445-450.
23. Boldt J, Wollbrueck M, Menges T, Diridis K, Hempelmann G. Regulation of circulatory homeostasis in the critically ill - a comparison between traumatized and septic patients. *J.Clin.Int.Care* 1994;5:164-171.
24. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann.Intern.Med.* 1991;115:457-469.

25. Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann.Intern.Med.* 1996;125:680-687.
26. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;101:1644-1655.
27. Bone RC, Sprung CL, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure. *Crit Care Med.* 1992;20:724-726.
28. Borrelli E, Roux LP, Grau GE, Girardin E, Ricou B, Dayer J, Suter PM. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Crit Care Med.* 1996;24:392-397.
29. Bouillon B, Kramer M, Tiling T, Neugebauer E. Trauma Score Systeme als Instrument der Qualitätskontrolle. *Unfallchirurg* 1993;96:55-61.
30. Bouillon B, Lefering R, Vorweg M, Tiling T, Neugebauer E, Troidl H. Trauma score systems: Cologne Validation Study. *J.Trauma* 1997;42:652-658.
31. Calandra T, Gerain J, Heumann D, Baumgartner JD, Glauser MP. High circulating levels of interleukin-6 in patients with septic shock: evolution during sepsis, prognostic value, and interplay with other cytokines. The Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group. *Am.J.Med.* 1991;91:23-29.
32. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann.Intern.Med.* 1993;119:771-778.
33. Cavaillon JM, Munoz C, Fitting C, Misset B, Carlet J. Circulating cytokines: the tip of the iceberg? *Circ.Shock* 1992;38:145-152.
34. Chandler WL, Alessi MC, Aillaud MF, Henderson P, Vague P, Juhan V, I. Clearance of tissue plasminogen activator (TPA) and TPA/plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) complex: relationship to elevated TPA antigen in patients with high PAI-1 activity levels. *Circulation* 1997;96:761-768.
35. Chantry D, Turner M, Abney E, Feldmann M. Modulation of cytokine production by transforming growth factor-beta. *J.Immunol.* 1989;142:4295-4300.
36. Chaudry IH, Ayala A, Ertel W, Stephan RN. Hemorrhage and resuscitation: immunological aspects. *Am.J.Physiol* 1990;259:R663-R678.
37. Chen X, Christou NV. Protective effect of plasma in polymorphonuclear neutrophil-mediated cytotoxicity of endothelial cells in the systemic inflammatory response syndrome. *J.Leukoc.Biol.* 1998;63:68-74.
38. Cheng JJ, Chao YJ, Wung BS, Wang DL. Cyclic strain-induced plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) release from endothelial cells involves reactive oxygen species. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1996;225:100-105.
39. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N.Engl.J.Med.* 1995;332:1351-1362.
40. Cinat M, Waxman K, Vaziri ND, Daughters K, Yousefi S, Scannell G, Tominaga GT. Soluble cytokine receptors and receptor antagonists are sequentially released after trauma. *J.Trauma* 1995;39:112-118.
41. Crowther JR. ELISA. Theory and practice. *Methods Mol.Biol.* 1995;42:1-218.
42. Damas P, Canivet JL, De Groote D, Vrindts Y, Albert A, Franchimont P, Lamy M. Sepsis and serum cytokine concentrations. *Crit Care Med.* 1997;25:405-412.
43. Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, De Groote D, Franchimont P, Lamy M. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann.Surg.* 1992;215:356-362.
44. Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol.Chem.* 1993;268:10739-10745.
45. De Jonge E, Levi M, van der Poll T. Coagulation abnormalities in sepsis: relation with inflammatory response. *Curr Opin Crit Care* 2000;6:317-322.
46. de Vries JE, de W, Malefijt R. Immunosuppression and anti-inflammatory effects of human interleukin-10. 1996;302-308.
47. Debets JM, Kampmeijer R, van der Linden MP, Buurman WA, van der Linden CJ. Plasma tumor necrosis factor and mortality in critically ill septic patients. *Crit Care Med.* 1989;17:489-494.
48. Deitch EA, Bridges RM. Effect of stress and trauma on bacterial translocation from the gut. *J.Surg.Res.* 1987;42:536-542.

49. Deitch EA, Bridges W, Berg R, Specian RD, Granger DN. Hemorrhagic shock-induced bacterial translocation: the role of neutrophils and hydroxyl radicals. *J.Trauma* 1990;30:942-951.
50. Deutschman CS. Acute-phase responses and SIRS/MODS: the good, the bad, and the nebulous. *Crit Care Med.* 1998;26:1630-1631.
51. Doherty PC. Cell-mediated cytotoxicity. *Cell* 1993;75:607-612.
52. Eigler A, Sinha B, Hartmann G, Endres S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol.Today* 1997;18:487-492.
53. Eiseman B, Beart R, Norton L. Multiple organ failure. *Surg.Gynecol.Obstet.* 1977;144:323-326.
54. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg FW. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood* 1995;85:1341-1347.
55. Ertel W, Morrison MH, Ayala A, Chaudry IH. Insights into the mechanisms of defective antigen presentation after hemorrhage. *Surgery* 1991;110:440-445.
56. Ertel W, Trentz O. Polytrauma und Multiorganversagen. *Definition-Pathophysiologie-Therapie. Zentralbl.Chir* 1994;119:159-167.
57. Esmon C, Taylor F, Snow R. Inflammation and Coagulation: linked processes potentially regulated through a common pathway mediated by protein C. *Thromb.Haemost.* 1991;66:160-165.
58. Faist E, Baue AE, Dittmer H, Heberer G. Multiple organ failure in polytrauma patients. *J.Trauma* 1983;23:775-787.
59. Faist E, Hartl WH, Baue AE. Immunmechanistik der posttraumatischen Hyperinflammation und Sepsis. *Immun.Infekt.* 1994;22:203-213.
60. Faist E, Kupper TS, Baker CC, Chaudry IH, Dwyer J, Baue AE. Depression of cellular immunity after major injury. Its association with posttraumatic complications and its reversal with immunomodulation. *Arch.Surg.* 1986;121:1000-1005.
61. Faist E, Mewes A, Baker CC, Strasser T, Alkan SS, Rieber P, Heberer G. Prostaglandin E2 (PGE2)-dependent suppression of interleukin alpha (IL-2) production in patients with major trauma. *J.Trauma* 1987;27:837-848.
62. Faist E, Schinkel C, Zimmer S. Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation. *World J.Surg.* 1996;20:454-459.
63. Ferguson KL, Brown L. Bacteremia and sepsis. *Emerg.Med.Clin.North Am.* 1996;14:185-195.
64. Fisher-CJ J, Yan SB. Protein C levels as a prognostic indicator of outcome in sepsis and related diseases. *Crit Care Med* 2000;28:S49-S56.
65. Foster D, Doig GS. Clinical Trials for the Evaluation of Sepsis Therapies. In: Vincent JL, ed. *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine.* 1997;149-157.
66. Fourrier F, Chopin C, Huart JJ. Doubleblind, placebo-controlled trial of anti-thrombin III concentrates in septic shock with disseminated intravascular coagulation. *Chest* 1993;104:882-888.
67. Fourrier F, Jourdain M, Tournais A, Caron C, Goudemand J, Chopin C. Coagulation inhibitor substitution during sepsis. *Intensive Care Med.* 1995;21 Suppl 2:S264-S268.
68. Friedl HP, Trentz O. Polytrauma: Definition, Schock, Multiorganversagen. *Unfallchirurgie* 1992;18:64-68.
69. Frieling JT, Sauerwein RW, Wijdenes J, Hendriks T, van der Linden CJ. Soluble interleukin 6 receptor in biological fluids from human origin. *Cytokine* 1994;6:376-381.
70. Fry DE, Pearlstein L, Fulton RL, Polk-HC J. Multiple system organ failure. The role of uncontrolled infection. *Arch.Surg.* 1980;115:136-140.
71. Gando S, Kameue T, Nanzaki S, Nakanishi Y. Disseminated intravascular coagulation is a frequent complication of systemic inflammatory response syndrome. *Thromb.Haemost.* 1996;75:224-228.
72. Gangiuliani G, Mancini A, Gui D. Validation of a severity of illness score (APACHE II) in a surgical intensive care unit. *Intensive Care Med.* 1989;15:519-522.
73. Goris RJ. Conclusions of the workshops held during the Second International Congress on The Integrated Approach to Trauma Care, Nijmegen, May 1995. *Eur.J.Emerg.Med.* 1995;2:236-238.
74. Goris RJ. MODS/SIRS: result of an overwhelming inflammatory response? *World J.Surg.* 1996;20:418-421.
75. Goris RJ. MODS/SIRS conditions. *World J.Surg.* 1997;21:344.
76. Goris RJ, Boekholtz WK, van Bebber IP, Nuytinck JK, Schillings PH. Multiple-organ failure and sepsis without bacteria. An experimental model. *Arch.Surg.* 1986;121:897-901.
77. Goris RJ, te-Boekhorst TP, Nuytinck JK, Gimbrere JS. Multiple-organ failure. Generalized autodestructive inflammation? *Arch.Surg.* 1985;120:1109-1115.
78. Graninger W, Wenisch C. Pentoxifylline in severe inflammatory response syndrome. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1995;25 Suppl 2:S134-S138.

79. Grant PJ. Polymorphisms of coagulation/fibrinolysis genes: gene environment interactions and vascular risk. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 1997;57:473-477.
80. Grbic JT, Mannick JA, Gough DB, Rodrick ML. The role of prostaglandin E2 in immune suppression following injury. *Ann.Surg.* 1991;214:253-262.
81. Gross R. Indices und Scores. *DtÄrztebl* 1989;86:1578-1579.
82. Hack CE, Thijs LG. The orchestra of mediators in the pathogenesis of septic shock: A review. 1991;232-246.
83. Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, Armes LG, Sommer A, Eisenberg SP, Thompson RC. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 1990;343:336-340.
84. Hartury J, Erpelt B. *Multivariate Statistik*. München: Oldenburg Verlag GmbH, 1992.
85. Heck E, Edgar MA, Hunt JL, Baxter CR. A comparison of leukocyte function and burn mortality. *J.Trauma* 1980;20:75-77.
86. Hempelmann G, Trentz OA, Trentz O, Müller H, Oestern HJ, Sturm J. Die Behandlung des Schocks bei polytraumatisierten Patienten. *Unfallchirurgie* 1981;7:116-121.
87. Hermans PWM, Hibberd ML, Booy R, Daramola OA, Hazelzet JA, de Groot R, Levin M, and the Meningococcal Research Group. 4G/5G promotor polymorphism in the plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and outcome of meningococcal disease. *Lancet* 1999;354:556-559.
88. Hinshaw LB, Emerson-TE J, Taylor-FB J, Chang AC, Duerr M, Peer GT, Flournoy DJ, White GL, Kosanke SD, Murray CK, et al. Lethal *Staphylococcus aureus*-induced shock in primates: prevention of death with anti-TNF antibody. *J Trauma* 1992;33:568-573.
89. Hoch RC, Rodriguez R, Manning T, Bishop M, Mead P, Shoemaker WC, Abraham E. Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production. *Crit Care Med.* 1993;21:839-845.
90. Holch M, Grob PJ, Fierz W, Glinz W, Geroulanos S. Immunosuppression durch Operationen und schwere Traumen. *Helv.Chir Acta* 1989;56:121-124.
91. Hosmer, Leneshaw. *Applied logistic regression*. In: Hosmer, Leneshaw, eds. *SPSS Advanced Statistics 6.1*. New York: John Wiley and Sons. 1994;374-383.
92. Hoyt DB, Ozkan AN. Immunosuppression in Trauma Patients. *Intensive Care Med.* 1991;6:71-90.
93. Huang SL, Su CH, Chang SC. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in chronic bronchitis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1997;156:1436-1439.
94. Jacobi J. Pathophysiology of sepsis. *Am J Health-Syst Pharm* 2002;59:3-8.
95. Jacobs S, Chang RW, Lee B. One year's experience with the APACHE II severity of disease classification system in a general intensive care unit. *Anaesthesia* 1987;42:738-744.
96. Jansen MJ, Hendriks T, Vogels MT, van der Meer JW, Goris RJ. Inflammatory cytokines in an experimental model for the multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med.* 1996;24:1196-1202.
97. Johnson K, Aarden L, Choi Y, De Groot E, Creasey A. The proinflammatory cytokine response to coagulation and endotoxin in whole blood. *Blood* 1996;87:5051-5060.
98. Jones GR, Lowes JA. The systemic inflammatory response syndrome as a predictor of bacteraemia and outcome from sepsis. *QJM.* 1996;89:515-522.
99. Karres I, Kremer JP, Steckholzer U, Kenney JS, Ertel W. Transforming growth factor-beta 1 inhibits synthesis of cytokines in endotoxin-stimulated human whole blood. *Arch.Surg.* 1996;131:1310-1316.
100. Keel M, Ecknauer E, Stocker R, Ungethüm U, Steckholzer U, Kenney J, Gallati H, Trentz O, Ertel W. Different pattern of local and systemic release of proinflammatory and anti-inflammatory mediators in severely injured patients with chest trauma. *J.Trauma* 1996;40:907-912.
101. Kim CS, Lee CH, Chung JW, Kim CD. Interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and interleukin-8 gene expression in human aural cholesteatomas. *Acta Otolaryngol.Stockh* 1996;116:302-306.
102. Kirschfink M. Controlling the complement system in inflammation. *Immunopharmacology* 1997;38:51-62.
103. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med.* 1985;13:818-829.
104. Knaus WA, Harrell-FE J, LaBrecque JF, Wagner DP, Pribble JP, Draper EA, Fisher-CJ J, Soli L. Use of predicted risk of mortality to evaluate the efficacy of anticytokine therapy in sepsis. The rHIL-1ra Phase III Sepsis Syndrome Study Group. *Crit Care Med.* 1996;24:46-56.
105. Knaus WA, Wagner DP. Acute physiology and chronic health evaluation and Glasgow coma scores. *Crit Care Med.* 1992;20:1736-1738.
106. Knaus WA, Wagner DP, Draper EA. The development of APACHE. *Crit Care Med.* 1989;17:181-185.

107. Knaus WA, Wagner DP, Draper EA, Zimmerman JE, Bergner M, Bastos PG, Sirio CA, Murphy DJ, Lotring T, Damiano A, et al. The APACHE III prognostic system. Risk prediction of hospital mortality for critically ill hospitalized adults. *Chest* 1991;100:1619-1636.
108. Knaus WA, Zimmerman JE, Wagner DP, Draper EA, Lawrence DE. APACHE-acute physiology and chronic health evaluation: a physiologically based classification system. *Crit Care Med.* 1981;9:591-597.
109. Kochanek S, Radbruch A, Tesch H, Renz D, Doerfler W. DNA methylation profiles in the human genes for tumor necrosis factors alpha and beta in subpopulations of leukocytes and in leukemias. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991;88:5759-5763.
110. Köhler W. Zum Chi-Quadrat-Test bei Kreuztabellen. In: Köhler W, ed. *Biostatistik*. Berlin-Heidelberg-New York: Springer.1996;2.Auflage:58-70.
111. Kristiansson M, Soop M, Saraste L, Sundqvist KG. Cytokines in stored red blood cell concentrates: promoters of systemic inflammation and simulators of acute transfusion reactions? *Acta Anaesthesiol.Scand.* 1996;40:496-501.
112. Ksontini R, MacKay SL, Moldawer LL. Revisiting the role of tumor necrosis factor alpha and the response to surgical injury and inflammation. *Arch.Surg* 1998;133:558-567.
113. Larsen R. Sepsis, SIRS, MODS - Neue Ergebnisse, unbeantwortete Fragen. *Anaesthesist* 1996;45:311.
114. Levine JH, Durham RM, Moran J, Baue A. Multiple organ failure: is it disappearing? *World J.Surg.* 1996;20:471-473.
115. Lijnen HR, Moons L, Beelen V, Carmelie P, Collen D. Biological effects of combined inactivation of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 gene function in mice. *Thromb.Haemost.* 1995;74:1126-1131.
116. Liu M, Slutsky AS. Anti-inflammatory therapies: application of molecular biology techniques in intensive care medicine. *Intensive Care Med.* 1997;23:718-731.
117. MacKenzie EJ. Injury severity scales: overview and directions for future research. *Am.J.Emerg.Med.* 1984;2:537-549.
118. Mammen EF. The haematological manifestations of sepsis. *J.Antimicrob.Chemother.* 1998;41 Suppl A:17-24.
119. Marano MA, Fong Y, Moldawer LL, Wei H, Calvano SE, Tracey KJ, Barie PS, Manogue K, Cerami A, Shires GT, et al. Serum cachectin/tumor necrosis factor in critically ill patients with burns correlates with infection and mortality. *Surg.Gynecol.Obstet.* 1990;170:32-38.
120. Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, Grandone E, Pennelli O, Di Minno G. The PAI-1 gene locus 4G/5G polymorphism is associated with a family history of coronary artery disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1998;18:152-156.
121. Marshall J. Both the disposition and the means of cure: "Severe SIRS," "sterile shock," and the ongoing challenge of description. *Crit Care Med.* 1997;25:1765-1766.
122. Marshall JC, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med* 1995;23:1638-1652.
123. Mascher B, Schmitt W, Csernok E, Tatsis E, Reil A, Gross WL, Seyfarth M. Polymorphisms in the tumor necrosis factor genes in Wegener's granulomatosis. *Exp.Clin.Immunogenet.* 1997;14:226-233.
124. Meert KL, Ofenstein JP, Genyey C, Sarnaik AP, Kaplan J. Elevated transforming growth factor-beta concentration correlates with posttrauma immunosuppression. *J.Trauma* 1996;40:901-906.
125. Menges T, Böning O, Little S, Langefeld T, Welters I. Genpolymorphisms of proinflammatory cytokines and serine proteases. Association with prognosis and outcome of trauma patients. *Anaesthesiologie und Intensivmedizin* 1999;40 Suppl.1:141.
126. Menges T, Engel J, Welters I, Wagner RM, Little S, Ruwoldt R, Wollbrueck M, Hempelmann G. Changes in blood lymphocyte populations after multiple trauma: association with posttraumatic complications. *Crit Care Med* 1999;27:733-740.
127. Menges T, Hermans PWM, Little S, Langefeld T, Böning O, Engel J, Sluijter M, de Groot R, Hempelmann G. Plasminogen-activator-inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism and prognosis of severely injured patients. *Lancet* 2001;357:1096-1097.
128. Menges T, Kostrzewa M, Welters I, Little S, Wagner RM, Gronau S, Müller U, Hempelmann G. Association of a bi-allelic NCO 1 polymorphism within the tumor necrosis factor locus with the prognosis and outcome of severely injured trauma patients. 1997;811-815.
129. Mesters RM, Helderbrand J, Utterback BG. Prognostic value of protein C concentrations in neutropenic patients at high risk of severe septic complications. *Crit Care Med* 2000;28:2209-2216.

130. Miller-Graziano CL, Fink M, Wu JY, Szabo G, Kodys K. Mechanisms of altered monocyte prostaglandin E2 production in severely injured patients. *Arch.Surg.* 1988;123:293-299.
131. Miller-Graziano CL, Szabo G, Griffey K, Mehta B, Kodys K, Catalano D. Role of elevated monocyte transforming growth factor beta (TGF beta) production in posttrauma immunosuppression. *J.Clin.Immunol.* 1991;11:95-102.
132. Mizuno M, Yoshida J. Tumor necrosis factor-alpha gene transfer augments anti-Fas antibody-mediated apoptosis in human glioma cells. *Jpn.J.Cancer Res.* 1996;87:543-547.
133. Moor E, Hamsten A, Karpe F, Bavenholm P, Blomback M, Silveira A. Relationship of tissue factor pathway inhibitor activity to plasma lipoproteins and myocardial infarction at a young age. *Thromb.Haemost.* 1994;71:707-712.
134. Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Surg.Clin.North Am.* 1995;75:257-277.
135. Moore FA, Sauaia A, Moore EE, Haenel JB, Burch JM, Lezotte DC. Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon. *J.Trauma* 1996;40:501-510.
136. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. In: Wu R, ed. *Methods in Enzymology*. San Diego: Academic Press, 1987;342-354.
137. Nast KD, Waydhas C, Jochum M, Duswald KH, Machleidt W, Spannagl M, Schramm W, Fritz H, Schweiberer L. Biochemische Faktoren als objektive Parameter für die Vorhersage der Prognose bei polytraumatisierten Patienten. *Unfallchirurg* 1992;95:59-66.
138. Neidhardt R, Keel M, Steckholzer U, Safret A, Ungethuen U, Trentz O, Ertel W. Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients. *J.Trauma* 1997;42:863-870.
139. Nordt T, Bode C. Endogene Fibrinolyse bei Diabetes mellitus und koronarer Herzkrankheit. *DtÄrztbl* 2 A.D.;99:354-364.
140. Nystrom PO. The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. *J.Antimicrob.Chemother.* 1998;41 Suppl A:1-7.
141. O'Mahony JB, Palder SB, Wood JJ, McIlvaine A, Rodrick ML, Demling RH, Mannick JA. Depression of cellular immunity after multiple trauma in the absence of sepsis. *J.Trauma* 1984;24:869-875.
142. Oestern HJ, Kabus K. Vergleich unterschiedlicher Trauma Score Systeme. Ein Überblick. *Unfallchirurg* 1994;97:177-184.
143. Oestern HJ, Kabus K, Neumann G. Der Hannoversche Polytraumaschlüssel. *Hefte Unfallheilkunde* 1991;97:210-215.
144. Oestern HJ, Trentz O, Kolbow H, Hempelmann G, Trentz OA, Donay F. Cardiorespiratory and metabolic patterns in multiple trauma patients. *Resuscitation* 1979;169-183.
145. Oestern HJ, Tscherne H, Sturm J, Nerlich M. Klassifizierung der Verletzungsschwere. *Unfallchirurg* 1985;88:465-472.
146. Oh TE, Hutchinson R, Short S, Buckley T, Lin E, Leung D. Verification of the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation scoring system in a Hong Kong intensive care unit. *Crit Care Med.* 1993;21:698-705.
147. Pajkrt D, van der PT, van Deventer SJ. Inflammatory response during human endotoxemia. 1997;14-31.
148. Paul NL, Millet I, Ruddle NH. The lymphotoxin promoter is stimulated by HTLV-I tax activation of NF-kappa B in human T-cell lines. *Cytokine* 1993;5:372-378.
149. Pauli U, Beutler B, Peterhans E. Porcine tumor necrosis factor alpha: cloning with the polymerase chain reaction and determination of the nucleotide sequence. *Gene* 1989;81:185-191.
150. Pinsky MR. Clinical studies on cytokines in sepsis: role of serum cytokines in the development of multiple-systems organ failure. *Nephrol.Dial.Transplant.* 1994;9 Suppl 4:94-98.
151. Pinsky MR. Organ-specific therapy in critical illness: interfacing molecular mechanisms with physiological interventions. *J.Crit Care* 1996;11:95-107.
152. Pittet D, Rangel FS, Li N, Tarara D, Costigan M, Rempe L, Jebson P, Wenzel RP. Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: incidence, morbidities and outcomes in surgical ICU patients. *Intensive Care Med.* 1995;21:302-309.
153. Pociot F, Wilson AG, Nerup J, Duff GW. No independent association between a tumor necrosis factor-alpha promoter region polymorphism and insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur.J.Immunol.* 1993;23:3050-3053.
154. Pontoppidan H, Geffin B, Lowenstein E. Acute respiratory failure in the adults. *N.Engl.J Med* 1972;287:743-752.
155. Randolph MM, White GL, Kosanke SD, Bild G, Carr C, Galluppi G, Hinshaw LB, Taylor-FB J. Attenuation of tissue thrombosis and hemorrhage by ala-TFPI does not account for its protection

- against *E. coli* - a comparative study of treated and untreated non-surviving baboons challenged with LD100 *E. coli*. *Thromb.Haemost.* 1998;79:1048-1053.
156. Regel G, Grotz M, Weltner T, Sturm JA, Tscherne H. Pattern of organ failure following severe trauma. *World J.Surg.* 1996;20:422-429.
 157. Regel G, Lobenhoffer P, Grotz M, Pape HC, Lehmann U, Tscherne H. Treatment results of patients with multiple trauma: an analysis of 3406 cases treated between 1972 and 1991 at a German Level I Trauma Center. *J.Trauma* 1995;38:70-78.
 158. Reinhart K, Menges T, Gardlund B, Zwaveling JH, Smithes M, Vincent JL, Tellado JM, Salgado-Remigio A, Zimlichmann R, Withington S, Tschaikowsky K, Brase R, Damas P, Kupper H, Kempeni J, Eiselstein J, Kaul M, The AFELIMOMAB Sepsis Study Group. Randomized, placebo-controlled trial of the anti-tumor necrosis factor antibody fragment afelimomab in hyperinflammatory response during severe sepsis: The RAMSES Study. *Crit Care Med* 2001;29:765-769.
 159. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Miletich JP. Arterial and venous thrombosis is not associated with the 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor gene in a large cohort of US men. *Circulation* 1997;95:59-62.
 160. Rossi M, Whitcomb S, Lindemann R. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes cultured with L-thyroxine and thyrocalcitonin: relation to severe root shortening. *Am.J.Orthod.Dentofacial Orthop.* 1996;110:399-404.
 161. Rutledge R, Fakhry SM, Rutherford EJ, Muakkassa F, Baker CC, Koruda M, Meyer AA. Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE II) score and outcome in the surgical intensive care unit: an analysis of multiple intervention and outcome variables in 1,238 patients. *Crit Care Med.* 1991;19:1048-1053.
 162. Ryan MP, Kutz SM, Higgins PJ. Complex regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) gene expression by serum and substrate adhesion. *Biochem.J.* 1996;314:1041-1046.
 163. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-1354.
 164. Sasaki H, Pollard RB, Schmitt D, Suzuki F. Transforming growth factor-beta in the regulation of the immune response. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 1992;65:1-9.
 165. Schimpff SC, Miller RM, Polkavetz S, Hornick RB. Infection in the severely traumatized patient. *Ann.Surg.* 1974;179:352-357.
 166. Schlag G, Redl H. Mediators of injury and inflammation. *World J.Surg.* 1996;20:406-410.
 167. Schlag G, Redl H, Hallstrom S. The cell in shock: the origin of multiple organ failure. *Resuscitation* 1991;21:137-180.
 168. Schleiffenbaum B, Spertini O, Tedder TF. Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J.Cell Biol.* 1992;119:229-238.
 169. Schraut W, Wendelgass P, Calzada-Wack JC, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock HW. TNF gene expression in monocytes of low and high responder individuals. *Cytokine* 1997;9:206-211.
 170. Seekamp A, Jochum M, Ziegler M, van Griensven M, Martin M, Regel G. Cytokines and adhesion molecules in elective and accidental trauma-related ischemia/reperfusion. *J.Trauma* 1998;44:874-882.
 171. Seitzer U, Swider C, Stuber F, Suchnicki K, Lange A, Richter E, Zabel P, Muller QJ, Flad HD, Gerdes J. Tumour necrosis factor alpha promoter gene polymorphism in sarcoidosis. *Cytokine* 1997;9:787-790.
 172. Seki T, Gelehrter TD. Interleukin-1 induction of type-1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) gene expression in the mouse hepatocyte line, AML 12. *J.Cell Physiol* 1996;168:648-656.
 173. Shenkin A, Fraser WD, Series J, Winstanley FP, McCartney AC, Burns HJ, Van Damme J. The serum interleukin 6 response to elective surgery. *Lymphokine Res.* 1989;8:123-127.
 174. Smith CS, Parker L, Shearer WT. Cytokine regulation by platelet-activating factor in a human B cell line. *J.Immunol.* 1994;153:3997-4005.
 175. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol.Biol.* 1975;98:503-517.
 176. Statistisches Bundesamt. Todesursachenstatistik. 1999. Wiesbaden.
 177. Stegnar M, Uhrin P, Peternel P, Mavri A, Salobir PB, Stare J, Binder BR. The 4G/5G sequence polymorphism in the promoter of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene: relationship to plasma PAI-1 level in venous thromboembolism. *Thromb.Haemost.* 1998;79:975-979.
 178. Stüber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* 1996;24:381-384.

179. Suter P, Armaganidis A, Beaufils F, Bonfill H, Burchardi H, Cook D, Fagot-Largeault A, Thijs LG, Vesconi S, Williams A. Consensus Conference organized by the ESICM and SRLF: Predicting outcome in ICU patients. *Intensive Care Med.* 1994;20:390-397.
180. Takasuka N, Matsuura K, Yamamoto S, Akagawa KS. Suppression of TNF-alpha mRNA expression in LPS-primed macrophages occurs at the level of nuclear factor-kappa B activation, but not at the level of protein kinase C or CD14 expression. *J.Immunol.* 1995;154:4803-4812.
181. Takata M, Abe J, Tanaka H, Kitano Y, Doi S, Kohsaka T, Miyasaka K. Intraalveolar expression of tumor necrosis factor-alpha gene during conventional and high-frequency ventilation. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1997;156:272-279.
182. Takayama TK, Miller C, Szabo G. Elevated tumor necrosis factor alpha production concomitant to elevated prostaglandin E2 production by trauma patients' monocytes. *Arch.Surg.* 1990;125:29-35.
183. Taylor-FB J. Studies on the inflammatory-coagulant axis in the baboon response to *E. coli*: regulatory roles of proteins C, S, C4bBP and of inhibitors of tissue factor. *Prog.Clin.Biol.Res.* 1994;388:175-194.
184. Teijink JA, Dwars BJ, Patka P, Haarman HJ. Scoring multitrauma patients: which scoring system? *Injury* 1993;24:13-16.
185. Tilney NL, Bailey GL, Morgan AP. Sequential system failure after rupture of abdominal aortic aneurysms: an unsolved problem in postoperative care. *Ann.Surg.* 1973;178:117-122.
186. Trentz O, Friedl HP. Multiorganversagen und Sepsis nach Polytrauma. In: Deutsch E, Kleinberger G, Lenz K, Ritz B, Schneewiess B, Schuster HP, Simbruner G, Slany J, eds. *Multiorganversagen.* Berlin-Heidelberg-Wien-New York: Springer, 1992;9-16.
187. Trentz OA, Hempelmann G, Trentz O, Mellmann J, Oestern HJ. Hämodynamik, Gasaustausch und Röntgenbefunde des Thorax bei Mehrfachverletzten mit Thoraxtrauma. *Anaesthesist* 1980;29:140-147.
188. Tscherne H, Trentz O, Sturm J. Mehrfachverletzungen. In: Heberer G, Köhler B, Tscherne H, eds. *Lehrbuch der Chirurgie.* Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1986:720-725.
189. Van Hinsbergh V, Kooistra T, van den Bergh E, Princen H, Fiers W, Emeis J. TNF increases the production of PAI in human endothelial cells in vitro and rats in vivo. *Blood* 1988;72:1467-1473.
190. Vincent JL. Prevention and therapy of multiple organ failure. *World J.Surg.* 1996;20:465-470.
191. Wadhwa J, Sood R. Multiple organ dysfunction syndrome. *Natl.Med.J.India* 1997;10:277-282.
192. Wahl SM. Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure. *J.Clin.Immunol.* 1992;12:61-74.
193. Wang P, Ba ZF, Chaudry IH. Endothelium-dependent relaxation is depressed at the macro- and microcirculatory levels during sepsis. *Am.J.Physiol* 1995;269:R988-R994.
194. Wang P, Ba ZF, Morrison MH, Ayala A, Dean RE, Chaudry IH. Mechanism of the beneficial effects of ATP-MgCl2 following trauma-hemorrhage and resuscitation: downregulation of inflammatory cytokine (TNF, IL-6) release. *J.Surg.Res.* 1992;52:364-371.
195. Wang P, Zhou M, Rana MW, Ba ZF, Chaudry IH. Differential alterations in microvascular perfusion in various organs during early and late sepsis. *Am.J.Physiol* 1992;263:G38-G43.
196. Waxman K. Is granulocyte elastase the cause of gastric mucosal injury after shock? *Crit Care Med.* 1996;24:914-915.
197. Waxman K. Shock: ischemia, reperfusion, and inflammation. *New Horiz.* 1996;4:153-160.
198. Waxman K. What mediates tissue injury after shock? *New Horiz.* 1996;4:151-152.
199. Waydhas C, Nast KD, Jochum M, Trupka A, Lenk S, Fritz H, Duswald KH, Schweiberer L. Inflammatory mediators, infection, sepsis, and multiple organ failure after severe trauma. *Arch.Surg.* 1992;127:460-467.
200. Waydhas C, Nast KD, Ruchholtz S, Schweiberer L. Praktische und theoretische Grenzen von Scoresystemen. *Unfallchirurg* 1994;97:185-190.
201. Westendorp. A clinical trial about the Anti-TNF. *Crit Care Med* 1997;25:1105-1107.
202. Westendorp R, Hottenga J, Slagboom P. Variation in plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and risk of meningococcal septic shock. *Lancet* 1999;35:561-563.
203. Wilson HM, Haits NE, Reid FJ, Booth NA. Interleukin-1 beta up-regulates the plasminogen activator/plasmin system in human mesangial cells. *Kidney Int.* 1996;49:1097-1104.
204. Wilson RF, Mammen EF, Tyburski JG. Antithrombin levels related to infections and outcome. *J Trauma* 1996;40:384-387.
205. Wiman B. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in plasma: its role in thrombotic disease. *Thromb.Haemost.* 1995;74:71-76.

206. Wray G, Thiernemann C. Inhibition of the activation of nuclear factor KB as a usual therapeutic approach for SIRS and Septic Shock. 1998;25-37.
207. Ye S, Green FR, Scarabin PY, Nicaud V, Bara L, Dawson SJ, Humphries SE, Evans A, Luc G, Cambou JP, et al. The 4G/5G genetic polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene is associated with differences in plasma PAI-1 activity but not with risk of myocardial infarction in the ECTIM study. Etude Cas-Temoins de l'infarctus du Myocarde. Thromb.Haemost. 1995;74:837-841.
208. Zenker W, Havemann D, Besch L. Verletzungsmuster-Leitlinie bei der Beurteilung des Mehrfachverletzten? Unfallchirurgie 1992;18:69-74.
209. Zimmerman JE, Knaus WA, Sun X, Wagner DP. Severity stratification and outcome prediction for multisystem organ failure and dysfunction. World J.Surg. 1996;20:401-405.
210. Zimmerman JE, Knaus WA, Wagner DP, Sun X, Hakim RB, Nystrom PO. A comparison of risks and outcomes for patients with organ system failure: 1982-1990. Crit Care Med. 1996;24:1633-1641.
211. Zoller B, Garcia dF, Dahlback B. A common 4G allele in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene as a risk factor for pulmonary embolism and arterial thrombosis in hereditary protein S deficiency. Thromb.Haemost. 1998;79:802-807.

8 Anhang: Verzeichnis der Labor- und Messparameter

8.1 Liste der verwendeten ELISA

- Variablen der Fibrinolyse

Medgenix Diagnostics S.A., Fleurus, Belgien

Gewebe-Plasminogenaktivator-Antigen (t-PA-Ag), Normalbereich im Plasma <5 pg/ml

Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI-1), Normalbereich im Plasma <5 pg/ml

- Variablen der Immunologie

BioSource Deutschland GmbH, Ratingen, Deutschland

Tumour necrosis factor alpha (TNF α), Normalbereich im Plasma <10 pg/ml

Tumour necrosis factor alpha Rezeptor I (TNF α rI), Normalbereich im Plasma <2 ng/ml

Tumour necrosis factor alpha Rezeptor II (TNF α rII), Normalbereich im Plasma <5 ng/ml

Interleukin 1 beta (IL-1 β), Normalbereich im Plasma <3,9 pg/ml

Interleukin 2 (IL-2), Normalbereich im Plasma <1,1 U/ml

Interleukin 2 Rezeptor (IL-2r), Normalbereich im Plasma <650 U/ml

Interleukin 6 (IL-6), Normalbereich im Plasma <300 ng/ml

Interleukin 8 (IL-8), Normalbereich im Plasma <10 pg/ml

Interleukin 10 (IL-10), Normalbereich im Plasma <50 pg/ml

Transforming growth factor beta (TGF- β), Normalbereich im Plasma <10 ng/ml

Prostaglandin 2 alpha (PGE $_2\alpha$), Normalbereich im Plasma <1,5 pg/ml

Tabelle 21: Liste der verwendeten ELISA und ihre Hersteller.

8.2 Liste der verwendeten Labormaterialien

8.2.1 DNA-Isolation

- Kernextraktionspuffer (100 ml):
 10,95 g Saccharose
 0,5 ml 1 M $MgCl_2$
 1 ml Triton X-100
 1 ml 1 M Tris pH 8,0
 anschließend steril filtrieren und bei 4 °C lagern
- DNA-Extraktionspuffer (100 ml):
 4 ml 1 M Tris pH 8,0
 4 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
 2 ml 5 M NaCl
 anschließend steril filtrieren und bei 4 °C lagern
- Proteinase K: Fa. Boehringer, Ingelheim
- RNase A: Fa. New England Biolabs, Beverly/Massachusetts, USA

8.2.2 PCR

- Thermocycler: Omnigene Hybaid, Heidelberg, Deutschland
 MJ PTC 225 Tetrad, MJ Research, USA
- TAQ-Polymerase: Fa. QIAGEN, Hilden, Deutschland
- Nukleotide: Fa. QIAGEN, Hilden, Deutschland
- Primer: Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Gelelektrophorese: Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Agarose: Fa. Biozym, Hamburg, Deutschland

8.2.3 Autoradiographische Detektion

- T4-PNK: Amersham, Braunschweig, Deutschland
- Nitrocellulose Hybond N+: Amersham, Braunschweig, Deutschland

8.2.4 MALDI-TOF MS

- genopure ds: Bruker Saxonia Analytik, Leipzig, Deutschland
- Thermosequenase: Amersham, Braunschweig, Deutschland
- Cycle-sequencing-Kit: Amersham, Braunschweig, Deutschland
- genopure oligo: Bruker Saxonia Analytik, Leipzig, Deutschland
- Anchor-Chip: Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland
- Scout MTP Ionenquelle: Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland
- BIFLEX III MALDI-TOF: Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland
- genotools™ SNP-Manager: Bruker Saxonia Analytik, Leipzig, Deutschland

9 Studienpatienten

9.1 Biometrische Daten, Genotyp, Scores

Code	Code PCR-Nr. PAI-1 Promotor 4G / 5G Polymorphismus	Sepsis	Eintritt Tag	Outcome	Alter	KG	Sex	ISS	PTS	MOD	Apache III
P-1	4G/4G	ja	5	gestorben	38	84	M	56	64	4	48
P-2	4G/5G	nein	0	überlebt	35	72	M	38	42	3	34
P-3	4G/5G	nein	0	überlebt	27	70	M	39	39	6	43
P-4	4G/5G	nein	0	überlebt	36	84	M	18	26	3	35
P-5	4G/5G	nein	0	überlebt	47	80	M	21	28	2	19
P-6	4G/4G	ja	3	gestorben	34	80	M	57	63	5	65
P-7	5G/5G	nein	0	überlebt	21	64	W	45	50	5	45
P-8	5G/5G	ja	6	gestorben	57	75	M	31	46	3	25
P-9	4G/5G	ja	7	gestorben	43	80	W	35	30	3	26
P-10	4G/5G	nein	0	überlebt	42	90	M	23	39	2	19
P-11	5G/5G	nein	0	überlebt	18	62	W	23	26	3	32
P-12	5G/5G	nein	0	überlebt	35	100	M	36	40	3	27
P-13	5G/5G	nein	0	gestorben	48	70	W	53	61	6	38
P-14	4G/5G	nein	0	überlebt	21	75	W	24	35	4	46
P-15	4G/4G	ja	5	gestorben	49	80	M	49	59	3	55
P-16	4G/4G	ja	6	gestorben	34	78	M	56	62	4	46
P-17	4G/4G	ja	5	gestorben	46	81	M	42	50	3	63
P-18	4G/4G	ja	6	gestorben	39	73	M	48	60	3	49
P-19	4G/5G	ja	7	gestorben	42	100	M	47	40	2	32
P-20	4G/5G	nein	0	überlebt	31	95	M	25	35	5	38
P-21	4G/4G	nein	0	überlebt	27	65	M	12	34	5	22
P-22	4G/4G	ja	6	gestorben	42	71	W	34	38	4	46
P-23	5G/5G	nein	0	überlebt	56	79	W	18	23	2	23
P-24	4G/5G	nein	0	überlebt	44	65	W	19	18	3	31
P-25	5G/5G	nein	0	überlebt	38	100	M	16	19	4	37
P-26	4G/5G	nein	0	überlebt	33	100	M	26	21	2	47
P-27	4G/4G	ja	6	gestorben	34	85	M	15	19	7	58
P-28	4G/4G	ja	7	überlebt	74	80	W	25	49	6	52
P-29	4G/4G	ja	6	überlebt	33	100	M	25	33	6	45
P-30	5G/5G	nein	0	überlebt	28	66	W	22	19	5	45
P-31	4G/4G	ja	6	überlebt	18	80	M	15	15	3	28
P-32	4G/4G	nein	0	überlebt	35	83	M	24	26	4	36
P-33	4G/5G	nein	0	überlebt	35	59	W	16	21	2	35
P-34	4G/5G	ja	6	überlebt	29	73	W	25	22	3	41
P-35	4G/5G	nein	0	überlebt	49	83	M	24	26	3	36
P-36	4G/5G	nein	0	überlebt	26	84	M	19	16	2	36
P-37	4G/5G	nein	0	überlebt	33	62	W	20	18	3	48
P-38	4G/5G	nein	0	überlebt	68	65	M	17	16	5	54
P-39	4G/5G	ja	8	gestorben	64	90	W	22	29	3	34
P-40	5G/5G	nein	0	überlebt	46	71	W	18	20	2	35

P-41	4G/4G	ja	9	überlebt	34	70	M	13	30	6	21
P-42	4G/5G	ja	9	überlebt	36	81	M	10	12	3	27
P-43	5G/5G	nein	0	überlebt	37	88	M	37	26	3	38
P-44	4G/5G	nein	0	überlebt	19	53	W	39	41	4	43
P-45	4G/5G	ja	4	gestorben	32	61	W	58	67	5	53
P-46	4G/5G	nein	0	überlebt	47	84	M	41	38	3	57
P-47	4G/5G	ja	4	gestorben	57	73	W	58	72	5	58
P-48	4G/5G	ja	4	gestorben	41	89	M	63	65	5	68
P-49	4G/4G	ja	6	überlebt	22	78	M	38	31	4	48
P-50	4G/4G	ja	4	gestorben	51	76	W	55	64	5	59
P-51	5G/5G	nein	0	überlebt	55	71	W	42	36	4	48
P-52	4G/5G	ja	4	gestorben	23	60	W	48	68	5	48
P-53	5G/5G	nein	0	überlebt	33	91	M	36	44	4	36
P-54	4G/5G	nein	0	überlebt	39	88	M	46	48	3	39
P-55	4G/4G	ja	7	gestorben	61	73	M	34	38	5	44
P-56	5G/5G	ja	5	überlebt	46	85	M	19	27	3	39
P-57	4G/5G	nein	0	überlebt	41	79	M	38	34	4	24
P-58	4G/5G	ja	3	überlebt	19	78	M	59	64	5	66
P-59	4G/4G	ja	9	gestorben	25	66	W	32	42	3	42
P-60	4G/4G	nein	0	gestorben	31	69	W	19	21	2	35
P-61	4G/4G	ja	5	überlebt	33	83	M	33	39	2	42
P-62	4G/5G	ja	8	überlebt	33	85	M	15	19	3	27
P-63	4G/5G	nein	0	überlebt	63	90	W	23	20	3	22
P-64	4G/5G	ja	5	überlebt	22	86	M	43	30	6	34
P-65	4G/5G	nein	0	überlebt	25	78	W	26	21	4	33

Tabelle 22: Die 65 Patienten der Studie im Verlauf ihrer Intensivtherapie.

10 Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1: Injury-Severity-Score (ISS) nach Baker et al. (1974).</u>	8
<u>Tabelle 2: Polytrauma-Schlüssel (PTS) nach Oestern et al. (1991).</u>	9
<u>Tabelle 3: Klinische Kriterien der Sepsis und des septischen Schocks.</u>	26
<u>Tabelle 4: MOD-Score nach Marshall (1994).</u>	27
<u>Tabelle 5: APACHE III-Score nach Knaus et al. (1991).</u>	29
<u>Tabelle 6: Codierung der Genotypen.</u>	49
<u>Tabelle 7: Morphometrische Daten der Patientengruppen.</u>	51
<u>Tabelle 8: Verteilung der Unfallmechanismen.</u>	52
<u>Tabelle 9: Prozentuale Verteilung der Verletzungen (Verletzungsmuster).</u>	53
<u>Tabelle 10: Prozentuale Verteilung der Operationen.</u>	54
<u>Tabelle 11: Keimspektrum der Patienten bei PAI-1-Genotypisierung.</u>	55
<u>Tabelle 12: Sepsis.</u>	56
<u>Tabelle 13: Häufigkeit von Organdysfunktionen der Patienten.</u>	56
<u>Tabelle 14: Verteilung der PAI-1-Genotypen.</u>	57
<u>Tabelle 15: Patienten verstorben/überlebt.</u>	57
<u>Tabelle 16: Sepsis.</u>	58
<u>Tabelle 17: MOD.</u>	58
<u>Tabelle 18: PAI-1-Messwiederholungsstudie.</u>	62
<u>Tabelle 19: Multiplikatoren zur Risikobeurteilung.</u>	63
<u>Tabelle 20: Risikoskala des PAI-1-Genotyps.</u>	63
<u>Tabelle 21: Liste der verwendeten ELISA und ihre Hersteller.</u>	88
<u>Tabelle 22: Die 65 Patienten der Studie im Verlauf ihrer Intensivtherapie.</u>	92

11 Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung 1:</u>	<u>Darstellung der Entzündungsreaktion am Endothel.</u>	14
<u>Abbildung 2:</u>	<u>Verbindung der Entzündungsreaktion mit dem Gerinnungssystem.</u>	17
<u>Abbildung 3:</u>	<u>Schematische Darstellung des PAI-1-Gens.</u>	19
<u>Abbildung 4:</u>	<u>Schematische Darstellung der PCR.</u>	36
<u>Abbildung 5:</u>	<u>Darstellung der Amplifikationsreihe der Elternstränge.</u>	38
<u>Abbildung 6:</u>	<u>Verfahren der radioaktiven Hybridisierung (Southern Blot).</u>	41
<u>Abbildung 7:</u>	<u>Prozessierung der Proben für MALDI-TOF MS.</u>	43
<u>Abbildung 8:</u>	<u>Bearbeitung der Proben mit Magnetic beads.</u>	43
<u>Abbildung 9:</u>	<u>Prinzip des MALDI-TOF MS-Messverfahrens.</u>	44
<u>Abbildung 10:</u>	<u>PAI-1-Autoradiographie.</u>	45
<u>Abbildung 11:</u>	<u>PAI-1 MALDI-TOF MS-Analyse.</u>	46
<u>Abbildung 12:</u>	<u>Plasmaspiegel PAI-1.</u>	59
<u>Abbildung 13:</u>	<u>Plasmaspiegel t-PA.</u>	60
<u>Abbildung 14:</u>	<u>Plasmaspiegel TGF-beta.</u>	60
<u>Abbildung 15:</u>	<u>Plasmaspiegel TNF-alpha.</u>	61
<u>Abbildung 16:</u>	<u>Plasmaspiegel IL-1 beta.</u>	61

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

geboren am 13.07.1968 in Bad Nauheim

Staatsangehörigkeit deutsch

Eltern Geoffrey R. Little

Christina Little

Ausbildungsdaten

Schul Ausbildung 1974-1978 Grundschule in Reichelsheim / Wett.
 1978-1984 Augustinerschule in Friedberg, Gymnasium
 1984-1987 Johann-Philipp-Reis Schule in Friedberg,
 Abschluss: Abitur

Zivildienst 1988-1989

Berufsausbildung 1990 Rettungssanitäter
 1993 Praxisanleiter im Rettungsdienst
 1994 Anerkennung als Rettungsassistent

Studium Humanmedizin an der JLU Gießen 1992 bis Mai 2001

1996 Physikum

1998 1. Staatsexamen

2000 2. Staatsexamen

Mai 2000 Praktisches Jahr

Mai 2001 3. Staatsexamen

Berufstätigkeit

Arzt im Praktikum,

Abteilung Anaesthesiologie,

Intensivmedizin, Schmerztherapie

am Universitätsklinikum Gießen

(Leiter: Prof. Dr. Dr. h.c. G. Hempelmann)

Juli 2001 bis Dezember 2002

seit Januar 2003 Assitenzarzt,

Abteilung Anaesthesiologie,

Intensivmedizin, Schmerztherapie

am Universitätsklinikum Gießen

(Leiter: Prof. Dr. Dr. h.c. G. Hempelmann)

13 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt:

Herrn PD Dr. T. Menges,

für die ausgesprochen engagierte Betreuung dieser Arbeit, der Begleitung mit Rat und Tat meiner ersten beruflichen Schritte und dem hohen Maß an persönlichem Engagement über Berufliches hinaus.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. G. Hempelmann,

möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas und die mir erwiesene großzügige Unterstützung herzlich danken.

Herrn Dr. M. Kostrzewa,

(Bruker Daltonik Bioanalytik GmbH, Leipzig),

für die Einarbeitung in die Grundlagen molekularbiologischer Verfahren und für die praktische Hilfestellung bei der Durchführung der molekulargenetischen Untersuchungen.

Herrn Dr. F. Stahl,

(Gesellschaft für biotechnologische Forschung, Braunschweig)

für „Tipps und Tricks“ aus der Molekularbiologie.

Herrn Dr. En-lieng Lau (Tainan, Taiwan),

für die gute Gesellschaft und manch gutes Essen bei langen Labornächten.

Frau Dr. T. Langefeld, Herrn J. Stricker und Herrn O. Böning

für die ausgesprochen angenehme und freundschaftliche Zusammenarbeit bei der Durchführung unserer gemeinsamen Studien.

Frau B. Weber,

für ihr stets großzügiges Entgegenkommen bei technischen und organisatorischen Fragen des Laboralltags.

Herrn Dipl. Math. J. Reitze und **Herrn Dipl. Math. M. Mogk**,

(Büro für Statistik, Gießen),

für die bereitwillige Unterstützung bei der Durchführung der aufwändigen biometrischen Verfahren zur Analyse der klinischen und experimentellen Daten.

Meiner Familie, insbesondere meiner lieben **Frau Maren** und meinem **Sohn Niklas**, die durch ihre große Unterstützung, Geduld und Anteilnahme das Zustandekommen dieser Arbeit mit ermöglicht haben.